

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ – ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση της τοξικότητας της αμμωνίας  
και των νιτρωδών ιόντων στην επιβίωση του  
γόνου της γαρίδας *Palaemon adspersus*»**

**Χαράλαμπος Νικολόπουλος**

Εισηγητής  
Δρ Νικόλαος Βλάχος  
ΕΔΙΠ

**Μεσολόγγι 2017**

*Στους γονείς μου*

## Ευχαριστίες

Μέσα από την παρούσα πτυχιακή εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα πτυχιακή εργασία, η πραγματοποίηση της οποίας δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την καθολική τους συμπαράσταση.

Ευχαριστώ τον Δρ Βλάχο Νικόλαο, ΕΔΙΠ, επιβλέπων της πτυχιακής εργασίας, για την επιστημονική καθοδήγηση, τις συμβουλές και εύστοχες παρατηρήσεις που μου υπέδειξε κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ την Δρ Βλασούλα Μπεκιάρη, Επίκουρη Καθηγήτρια, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις συμβουλές και χρήσιμες υποδείξεις που μου υπέδειξε κατά τη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Δρ Αλέξιο Ράμφο Επίκουρο Καθηγητή, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές που μου υπέδειξε κατά τη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, συνεισφορά, κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	3
Περίληψη .....	5
Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1. Γενικά Στοιχεία-Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας.....	6
1.1.1 Τοξικότητα της Αμμωνίας (T.A.N) .....	6
1.1.2.Τοξικότητα νιτρωδών ιόντων (NO <sub>2</sub> -N) .....	10
1.2. Σκοπός Πτυχιακής Εργασίας .....	11
Κεφάλαιο 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	12
2.1. Πειραματόζωα.....	12
2.2. Εγκλιματισμός .....	12
2.3. Πειραματική Διαδικασία.....	13
2.4. Μεθοδολογία Έρευνας.....	17
Κεφάλαιο 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	19
3.1. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την αντοχή της γαρίδας στην αμμωνία .....	19
3,2. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την αντοχή της γαρίδας στα νιτρώδη ιόντα	21
Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	25
Κεφάλαιο 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	27
Abstract.....	31

## Περίληψη

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε για να διερευνήσει την επίδραση της τοξικότητας της ολικής αμμωνίας και των νιτρωδών ιόντων στην γαρίδα *Palaemon adspersus* με στάσιμες βιολογικές διαδικασίες. Η γαρίδα της Μεσογείου, *Palaemon adspersus*, είναι ένα ενδημικό είδος της λιμνοθάλασσας Μεσολογγίου στη Δυτική Ελλάδα. Τα πειράματα τοξικότητας βασίστηκαν στην καταγραφή των ποσοστών θνησιμότητας της γαρίδας στις διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ ο υπολογισμός της μέσης θνησιγόνου συκέντρωσης που προκαλεί θάνατο στο 50% του πληθυσμού (LC<sub>50</sub>) έγινε με τη μέθοδο probit.

Σε κάθε τεστ χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα γαρίδας *Palaemon adspersus* (ηλικίας 25-45 d) με μέσο βάρος και μήκος  $0,40 \pm 0,02$  g και  $3,2 \pm 0,02$  cm, αντίστοιχα. Η 24 ωρη έκθεση των γαριδών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NH<sub>4</sub>Cl (0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,15, 2, 25, 2,5, 2,75, 3,0 και 3,25 g / L) με αλατότητα 30 ppt, 22 °C και pH 7,8. Επίσης, σε ξεχωριστό πείραμα, άτομα γαρίδας *Palaemon adspersus* με το ίδιο μέσο βάρος και μήκος εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaNO<sub>2</sub> (0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0004, 0,0006, 0,0008, 0,001, 0,003, 0,005, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,07, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 0,9, 1,0, 1,5, 2 και 3,0 g / L) με την ίδια αλατότητα, θερμοκρασία και pH για διάστημα 24 h. Η καταγραφή της θνησιμότητας γίνονταν σε καθημερινή βάση και οι νεκρές γαρίδες απομακρύνονταν καθημερινά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η 24 h-LC<sub>50</sub> τιμή για την ολική αμμωνία και τα νιτρώδη ιόντα βρέθηκε να είναι 1,87 mg/L και 7,96 mg/L αντίστοιχα. Επίσης, τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω μελέτες προκειμένου να μελετηθούν οι διαδικασίες με τις οποίες οι χημικές ουσίες επηρεάζουν τις αιματολογικές και βιοχημικές μεταβολές της γαρίδας.

Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί η επίδραση της ολικής αμμωνίας σε συνδυασμό με τα νιτρώδη ιόντα, σε διαφορετικές αλατότητες, που θα ήταν σημαντικό για την ανάπτυξη και εκτροφή της γαρίδας σε βιομηχανικό επίπεδο.

**Λέξεις Κλειδιά:** Test τοξικότητας στην αμμωνία, Test τοξικότητας στα νιτρώδη ιόντα, *Palaemon adspersus*, LC<sub>50</sub>.

## Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Γενικά Στοιχεία-Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας

Η παγκόσμια παράγωγή υδατοκαλλιέργειας αυξήθηκε ραγδαία τις δυο τελευταίες δεκαετίες και εκτιμάται ότι αυξήθηκε κατά 250% (FAO 1998). Για να στηριχτεί τεχνολογικά η μαζική παράγωγή γόνου καθιερώθηκαν διάφορες τεχνικές για διάφορα είδη ψαριών που παρουσιάζουν αυξημένη οικονομική σημασία.

Η υδατοκαλλιέργεια σήμερα στηρίζεται στην παράγωγή γόνου στα εκκολαπτήρια. Οι πρακτικές που εφαρμόζονται στα εκκολαπτήρια για τα πιο επιτυχημένα είδη ψαριών και δεκαπόδων καρκινοειδών επιτρέπουν την παροχή επαρκούς αριθμού γόνου με αποτέλεσμα η ποιότητα των προνυμφών να αυξάνεται. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις μεθόδους που εφαρμόζονται για τον έλεγχο της ποιότητας του γόνου στο πρώιμο και ύστερα στάδια ανάπτυξης των γαριδών.

Η αμμωνία αποτελεί το κύριο μεταβολικό προϊόν των υδρόβιων ζώων που προκύπτει από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών και αμινοξέων, των πουρινών και πυριμιδινών (Wajsbort, et al.1991). Στα εντατικά συστήματα εκτροφής η αμμωνία μπορεί να αυξηθεί σε εξαιρετικά επικίνδυνα επίπεδα για την επιβίωση και ανάπτυξη των ζώων, λόγω των υψηλών ιχθυοφορτίσεων, της αποσύνθεσης των υπολειμμάτων της ακατανάλωτης τροφής και της μη επαρκούς ανανέωσης του νερού.

Η οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων ( $\text{NH}_4^+$ ) σε νιτρώδη ιόντα πραγματοποιείται με τη δράση των βακτηρίων *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*. Οποιοδήποτε παράγοντες επηρεάζουν τη δράση και τον μεταβολισμό των βακτηρίων αυτών μπορεί να οδηγήσουν σε συσσώρευση των νιτρωδών, τα οποία επίσης χαρακτηρίζονται από τοξική δράση (Χώτος και συν. 2001).

#### 1.1.1 Τοξικότητα της Αμμωνίας (T.A.N)

Η αξιολόγηση της ποιότητας εφαρμόστηκε για πρώτη φορά μετρήθηκε η επιβίωση των προνυμφών στο φαγκρί (*Pagrus major*) για διάστημα 24 h μετά από έκθεση τους στον αέρα για διάστημα 5 sec (Watanabe et al. 1983). Έκτοτε, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι και τεχνικές αξιολόγησης της ποιότητάς τους, οι οποίες περιλαμβάνουν την έκθεση των ζώων σε μια σύντομη αλλά ακραία κατάσταση

(αλατότητα, θερμοκρασία, pH ή φορμώλη) όπου σε φυσιολογικές συνθήκες θα προσδιόριζε την ικανότητα τους να επιβιώσουν (Tackaert ,et al. 1989, Samocha *et al.* 1998).

Άλλες μέθοδοι που εφαρμόζονται στηρίζονται κυρίως στην παρατήρηση όπως για παράδειγμα, αλλαγές στον χρωματισμό τους, στην δραστηριότητά τους, σε μορφολογικούς δείκτες (Bauman & Jamandre 1990), στη βιοχημική σύνθεσή τους (περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα) (Arellano *et al.* 1990) αλλά και αλλαγές που παρατηρούνται στην ανάπτυξη χρωματοφόρων, στην παραμόρφωση του σώματος, στη ρύπανση και τη μυϊκή αδιαφάνεια (Fegan,et al, 1992).

Τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται αξιολογούν συνολικά την ποιότητα των προνυμφών. Ωστόσο, στην πλειοψηφία τους οι τεχνικές αυτές σχεδιάστηκαν για να αξιολογούν την ποιότητα του γόνου στα ύστερα στάδια ανάπτυξης δηλαδή όταν οι νύμφες απελευθερώνονται στις δεξαμενές κύριας ανάπτυξης (πάχυνση). Για τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των προνυμφών εκτός από το μέγεθος χρησιμοποιούνται πρακτικές όπως ο προσδιορισμός του μεγέθους του αυγού, ο ρυθμός και ο χρόνος εκκόλασης και ο ρυθμός επιβίωσης προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητα των ζώων.

Οι Bray *et al.* (1990) πρότειναν τη χρήση του μήκους της προνύμφης της γαρίδας όταν βρίσκεται στο στάδιο protozoa I, ενώ ο (Browdy,et al. 1992) πρότεινε ότι η ποιότητα τους εκτιμάται ανάλογα με την αντίδραση που παρουσιάζουν στο φως στο στάδιο του ναυπλίου. Στη γαρίδα του γλυκού νερού *Macrobrachium rosenbergii* χρησιμοποιούνται παρόμοια δεδομένα για το διαχωρισμό «υγιών» και «αδύναμων» προνυμφών (Singh & Philip 1995).

Η αμμωνία είναι ένα το κύριο προϊόν απέκκρισης στα υδρόβια ζώα (Kinne,et al, 1976) και οι μηχανισμοί της τοξικότητας και της θνησιγόνου συγκέντρωσης στα ψάρια και στις γαρίδες με εμπορικό ενδιαφέρον έχουν μελετηθεί εκτενώς (Tommaso *et al.* 1994). Στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας όπου διατηρούνται υψηλές πυκνότητες οργανισμών, το προϊόν του μεταβολισμού αυξάνεται και ως εκ τούτου η ποιότητα του νερού μπορεί να γίνει περιοριστικός παράγοντας ως προς τον αριθμό των οργανισμών που μπορούν να εκτραφούν (Boyd *et al.* 1979). Οι (Krom &.ra Rijn 1989). έχουν δείξει ότι η τοξικότητα της αμμωνίας στο θαλασσινό νερό είναι εντονότερη σε σχέση με την τοξικότητά της στο γλυκό νερό.

Η τοξικότητα της αμμωνίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH και σε μικρότερο βαθμό από τη θερμοκρασία (Thurston, *et al.* 1981). Η μη ιονισμένη

αμμωνία είναι περισσότερο τοξική σε σχέση με την ιονισμένη αμμωνία (Armstrong *et al.* 1978). Μελέτες σε ψάρια του γλυκού νερού έδειξαν αύξηση στην τοξικότητα της αμμωνίας σε χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου (DO) (Floyd *et al.* 1961, Thurston. *et al.* 1981). Αλλαγές στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου παρατηρούνται σε λίμνες αλλά και σε δεξαμενές που εκτρέφονται γαρίδες και ψάρια (Wajsbro,et al. 1987)

Η τοξικότητα της αμμωνίας στα καρκινοειδή δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ενώ οι πληροφορίες που αντλούνται στηρίζονται στον έλεγχο των βιολογικών λειτουργιών τους προκειμένου να αναπτυχθούν φυσιολογικά σε σχέση με τις εκδύσεις που παρατηρούνται. Στα καρκινοειδή παρατηρούνται αλλαγές στην επιδερμίδα και τον εξωσκελετό οι οποίες οφείλονται στην τοξικότητα της αμμωνίας (Passano,et al. 1960).

Η αμμωνία απαντάται σε δύο μορφές στα υδατικά διαλύματα τη μη ιονισμένη αμμωνία (NH<sub>3</sub>-N) και την ιονισμένη αμμωνία (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) (Emerson, et al.1975). Η αναλογία NH<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub><sup>+</sup> αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, το pH και τη μείωση της αλατότητας (Trussell,et al.1972,Whitfield,et al. 1978). Η μη ιονισμένη αμμωνία (NH<sub>3</sub>-N) είναι λιποφιλική και διαχέεται εύκολα στις αναπνευστικές μεμβράνες των οργανισμών, σε αντίθεση με την ιονισμένη αμμωνία (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) που είναι λιποφοβική και διαπερνά τις μεμβράνες δύσκολα.

Η αμμωνία αυξάνει την τοξικότητά της στα εντατικά συστήματα εκτροφής όταν ο ρυθμός αντικατάστασης του νερού είναι περίπου 30 % ανά εβδομάδα (Chen,et al. 1989). Η τοξικότητα της αμμωνίας μελετήθηκε εκτενώς από τους (Alabaster & Lloyd 1980, Coho & Armstrong 1981, Russo,et al1985). Η μέση θνησογόνος συγκέντρωση (LC50) της αμμωνίας για τις προνύμφες του είδους *P. Monodon* που έχει αναφερθεί είναι 6,00 mg/L (Chin & Chen 1987), για τα νεαρά άτομα είναι 1,76 mg/L (Chen & Lei 1990) και για τα αναπτυσσόμενα άτομα γαρίδας είναι τους 1,76 mg/L.(Chen *et al.* 1990). Η συσσώρευση αμμωνίας στο νερό επιφέρει καθυστέρηση στην ανάπτυξη της γαρίδας και σε ακραίες περιπτώσεις προκαλεί θάνατο (Wickins,et al.1976), (Armstrong,et al. 1978), (Chen,*et al.* 1990).

Υψηλά επίπεδα pH αυξάνουν τη συγκέντρωση (της μη ιονισμένης αμμωνίας NH<sub>3</sub>) σε σχέση με την ιονισμένη αμμωνία (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Fromm & Gillette 1968). Συνεπώς, αν τα επίπεδα αμμωνίας αυξάνονται, η έκκριση της μειώνεται με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδά της στο αίμα και στους ιστούς των ζωικών οργανισμών. Αυτό πιθανά να συμβάλει στην αύξηση του pH και να επηρεάζει τη σταθερότητα των



ενζυμικών αντιδράσεων και να οδηγεί στο θάνατο του ατόμου (Tomasso, et al. 1994). Η τοξική συγκέντρωση της μη ιονισμένης αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) μελετήθηκε για 9 είδη ασπόνδυλων. Οι 96-h  $\text{EC}_{50}$  τιμές στους  $15^\circ\text{C}$  και pH 7.6 και 8.2 κυμαίνονταν από 0,18 έως  $0,8 \text{ g/m}^3 \text{ NH}_3$ . Τα είδη αυτά κατατάχθηκαν με κριτήριο την ευαισθησία που παρουσιάζουν με την εξής σειρά (από το είδος με τη μεγαλύτερη ευαισθησία προς τη μικρότερη ευαισθησία):

*Paratya curvirastrul* (γαρίδα) < *Zephlebia dentatal* (μύγα) < *Zealandobius furcillatus* (μύγα) < *Lumbriculus variegates* (σκουλήκι) < *Fingernail clam* (αχιβάδα) < *Sphaerium navaezelandiae* (όστρακο) < *Potamopyrgus antipodarum* (όστρακο) < *Pycnocentria evecta* < *Paracalliope fluviatilis* (αμφίποδο).

Επίσης η θερμοκρασία δεν επηρεάζει ουσιαστικά την αυξημένη τοξικότητα της μη ιονισμένης αμμωνίας στα ασπόνδυλα που διαβιούν στους  $15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  και  $25^\circ\text{C}$ . Τα ασπόνδυλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην αμμωνία σε σχέση με τα ψάρια ( $\text{EC}_{50} \text{ g/m}^3 \text{ NH}_3$ ) (Richardson, et al. 1991).

Οι αγροτικές βιομηχανίες και οι καλλιέργειες αποβάλουν μεγάλες ποσότητες οργανικών αποβλήτων στα ποτάμια της Νέας Ζηλανδίας. Η οργανική υλη (άζωτο και φώσφορος) που αποβάλλεται στα γλυκά νερά από τα ψάρια αντιστοιχεί με αυτή που αποβάλλεται από μια πόλη με πληθυσμό 2,0-2,7 εκατομμ. άνθρωποι (Hickey & Rutherford 1980). Στα ποτάμια συστήματα οι ανησυχίες εστιάζονται στις πολλαπλές απορρίψεις που λαμβάνουν χώρα και επιδρούν στην αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας. Ο έλεγχος της ποιότητας του νερού στα ποτάμια συστήματα που αποστραγγίζονται σε αγροτικές εκτάσεις έδειξε ότι η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας κυμαίνεται από  $1 \text{ g/m}^3 \text{ NH}_3$  έως  $5 \text{ g/m}^3 \text{ NH}_3$ .

Η φωτοσύνθεση προκαλεί αύξηση στο pH και κατ' επέκταση στη συγκέντρωση της μη ιονισμένης αμμωνίας (USEPA 1985). Η συγκέντρωση της αμμωνίας, το pH και η θερμοκρασία επηρεάζουν την καταλληλότητα του νερού για εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών. Για παράδειγμα ποτάμια συστήματα με pH 7.5 και θερμοκρασία  $15^\circ\text{C}$  όπου διαβιούν σολομοί η μέση θνησιγόνος συγκέντρωση της αμμωνίας ( $\text{LC}_{50}$ ) σε διάστημα τεσσάρων ημερών είναι  $1.05 \text{ g/m}^3 \text{ NH}_3$ . Παρόλα αυτά, εάν το pH είναι 8.5, τότε η συνολική αμμωνία είναι μικρότερη από  $0,23 \text{ g/m}^3 \text{ NH}_3$ .

Τα τεστ χρόνιας έκθεσης αξιολογούν τις επιδράσεις σε μεγαλύτερη χρονική περίοδο αλλά είναι, χρονοβόρα και σπάνια διεξάγονταν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ζώου (La Point 1989). Τα τελευταία χρόνια δόθηκε περισσότερη προσοχή στα τεστ ελέγχου της συμπεριφοράς των ζώων ως εναλλακτική μέθοδο αξιολόγησης

των θανατηφόρων συγκεντρώσεων (Birge *et al* 1993, Serafy *et al* 1993, Harrell *et al* 1993, Little & DeLonay 1996, Boubee & Mocquart-Moulin 1997).

Η αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας στο νερό διαβίωσης των ιχθύων επιδρά στα ψάρια εκτός των άλλων και μέσω της πρόκλησης έντονου stress. Η παρατεταμένη παραμονή των ιχθύων σε κατάσταση πίεσης (stress) έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη έκκριση κορτιζόλης, η οποία δρα ανταγωνιστικά ως προς την αυξητική ορμόνη.

Τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης προκαλούν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των ιχθύων και αυτό οφείλεται στις καταβολικές ιδιότητες της, από τις οποίες επιδιώκεται η κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών αναγκών των ατόμων εξαιτίας της επίδρασης του stress. Η αδρεναλίνη, η νοραδρεναλίνη και η δοπαμίνη είναι ορμόνες που επίσης εκκρίνονται σε καταστάσεις stress για την κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών αναγκών, και επιδρούν αρνητικά στον ρυθμό αύξησης των ιχθύων λόγω της καταβολικής τους δράσης. Στην αύξηση των ψαριών επιδρά αρνητικά και η μειωμένη δράση των θυρεοειδικών ορμονών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αναβολική δράση (Παπουτσόγλου 1998).

### 1.1.2. Τοξικότητα νιτρωδών ιόντων (NO<sub>2</sub>-N)

Τα νιτρώδη είναι τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς μέσα σε ένα εύρος ppm. Ωστόσο υπάρχουν πολλές ενδοειδικές και διαειδικές διακυμάνσεις στις τιμές των LC<sub>50</sub>, οι οποίες οφείλονται κυρίως στις διαφορετικές χημικές συνθήκες του νερού (Alcaraz & Espina 1997). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των νιτρωδών και σχετίζονται με τη χημική σύνθεση του νερού διαβίωσης των ιχθύων είναι:

- pH
- θερμοκρασία
- Διαλυμένο οξυγόνο
- Μέγεθος
- Ηλικία –στάδιο ανάπτυξης

Η 24 h, 96 h and 192 h θνησιγόνος συγκέντρωση (LC<sub>50</sub>) για το είδος *P.monodon* ήταν 130, 8.6 και 4.5 mg NO<sub>2</sub>-N/L αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των νιτρωδών στην οποία δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα ήταν 9.7 και

τα 1,4 mg/L σε διάστημα 24 h και 168 h. Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις γαρίδες που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση νιτρώδους νατρίου 1,8 mg/L για διάστημα 8 ημερών. Οι προνύμφες της γαρίδας *Penaeus monodon* ηλικίας 4 d στο στάδιο της μεταμόρφωσης παρουσίασαν προοδευτική αύξηση στην αντοχή τους στο νιτρώδες νάτριο. Οι προνύμφες της γαρίδας *Penaeus monodon* έχουν μεγαλύτερη αντοχή όταν εκτίθενται επί 24 ώρου σε συγκεντρώσεις νιτρωδών 5,00 mg/L, 13,20 mg/L, 20,65 mg/L και 61,87 mg/L NO<sub>2</sub>-N.

Η θνησιγόνος συγκέντρωση (LC<sub>50</sub>) 48 h για τις γαρίδες που βρίσκονται στο στάδιο της μύσιδος προσδιορίστηκε στο 8,30 mg/L και 33,17 mg/L NO<sub>2</sub>-N. Η 72 h και 96 h έκθεσή των γαριδών έδειξε ότι η θνησιγόνος συγκέντρωση (LC<sub>50</sub>) αυξάνεται κατά πολύ περισσότερο (2053 mg/L και 1355 mg/L NO<sub>2</sub>- N) σε σχέση με τις γαρίδες που εκτέθηκαν σε νιτρώδη ιόντα για διάστημα 24 h. Ένα «ασφαλές επίπεδο» για τα νιτρώδη ιόντα υπολογίστηκε στο 1,36 mg/L NO<sub>2</sub> - N για το είδος *P. monodon* (Jiann-Chu Chen & Tzong- Shean Chin 1988).

Οι Schuler, *et al.* (2010), μελέτησαν την επίδραση της τοξικότητας των NO<sub>2</sub>-N στην επιβίωση της γαρίδας *Litopenaeus vonnamei* ηλικίας 4 d (25 έως 45 d PL) σε αλατότητα 10 ppt και θερμοκρασία 28°C και pH 7,8 και βρήκαν ότι η 48 h θνησιγόνος συγκέντρωση (LC<sub>50</sub>) ήταν 153,75 mg/L. Η γαρίδα *Penaeus monodon* ηλικίας 4 d ημερών εκτέθηκε σε νιτρώδη ιόντα για διάρκεια 48 h, 72 h & 96 h. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θνησιγόνος συγκέντρωση LC<sub>50</sub> -NO<sub>2</sub><sup>-</sup> N ήταν αντίστοιχα 12,66 mg/L, 9,69 mg/L και 5,69 mg/L (Chen & Chin 1987).

Επίσης οι Chen & Chin (1987), αναφέρουν ότι, αν οι γαρίδες *P. monodon* ηλικίας 4 d εκτεθούν σε μείγμα αμμωνίας και νιτρωδών ιόντων σε διάστημα 48 και 71 h αντίστοιχα, η τοξική δράση αυξάνει σε σχέση με τις γαρίδες που εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας η νιτρωδών ιόντων. Η αναλογία τοξικότητας της αμμωνίας και των νιτρωδών ιόντων ήταν 5L, οι τιμές LC<sub>50</sub> 48h , 72h και 96h ήταν 2,50, 1,56 και 0,85 μονάδες τοξικότητας τα οποία αντιστοιχούν σε 23,98 mg/L NH<sub>3</sub> – N (1,13 mg/L NH<sub>3</sub>-N) και 5,65 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N.

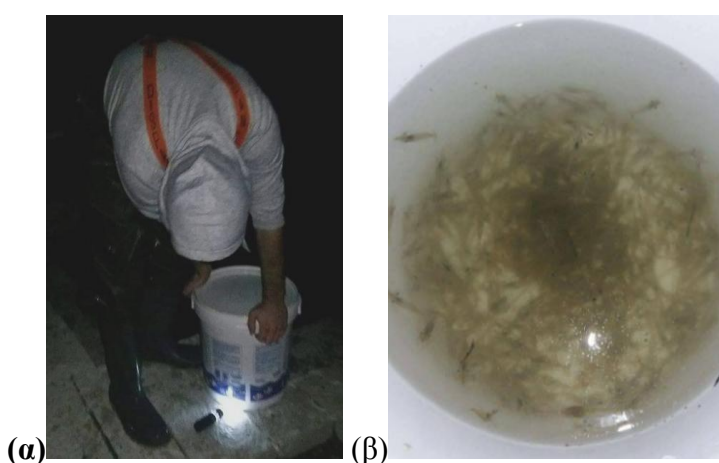
## 1.2. Σκοπός Πτυχιακής Εργασίας

Σκοπός της παρούσης πτυχιακής εργασίας είναι να παρουσιάσει, να διερευνήσει και να προσδιορίσει για πρώτη φορά τα όρια αντοχής (LC<sub>50</sub>) της γαρίδας του Μεσολογγίου *Palaemon adspersus* στην αμμωνία και στα νιτρώδη ιόντα.

## Κεφάλαιο 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

### 2.1. Πειραματόζωα

Οι γαρίδες του είδους *Palaemon adspersus* (Εικ.1) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αλιεύθηκαν από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου με κατάλληλο εξοπλισμό και μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς κουβάδες στο εργαστήριο των ενυδρείων του Τμήματος Τεχνολογίας Αλιείας-Υδατοκαλλιεργειών. Η αλιεία των γαριδών πραγματοποιήθηκε με απόχες δίχτυ και έλαβε χώρα κατά τις βραδινές ώρες. Οι γαρίδες που αλιευθήκαν είχαν μέσο βάρος  $0,40 \pm 0,02$  g και μέσο μήκος  $3,2 \pm 0,01$  cm.



Εικόνα 1. (α) Αλιεία Γαρίδας και αποθήκευση, (β) Μεταφορά της γαρίδας *Palaemon adspersus* από την λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου (Πηγή: Προσωπικό αρχείο).

### 2.2. Εγκλιματισμός

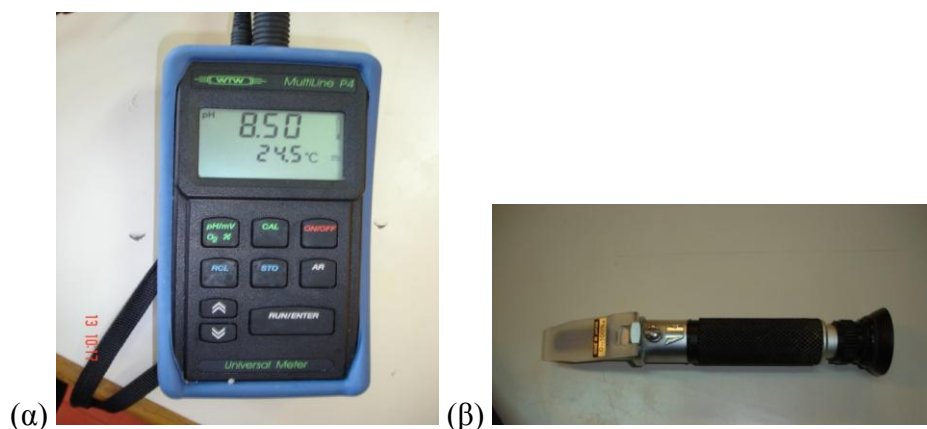
Οι γαρίδες με την άφιξή τους στο εργαστήριο τοποθετήθηκαν σε τρία γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 80 L. Σημειώνεται ότι το νερό που προστέθηκε στα γυάλινα ενυδρεία το πρώτο 24ώρο κατά το στάδιο του εγκλιματισμού τους προέρχονταν από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου το οποίο μεταφέρθηκε σε πλαστικό δοχείο για αποφυγή του stress (μεταβολή παραμέτρων νερού).

Για λόγους ασφαλείας και αποφυγής βακτηριακών προσβολών των γαριδών έγιναν προληπτικά μπάνια οξυτετρακυκλίνης για διάστημα 24 h. Σε 40 L νερού προστέθηκαν 10 gr οξυτετρακυκλίνης χωρίς να καταγραφούν αξιοσημείωτα ποσοστά θνησιμότητας. Μετά την πάροδο των 24 h το νερό έγινε ανανέωση του νερού με

θαλασσινό νερό αλατότητας 30 ppt το οποίο παρασκευάζονταν στο εργαστήριο από συνθετικό θαλασσινό αλάτι instant ocean®.

Ο αερισμός των ενυδρείων γίνονταν μέσω του κεντρικού συστήματος παροχής αέρα με ρυθμιζόμενη παροχή με επίπεδα κορεσμού 80%-85%. Η θερμοκρασία ήταν εκείνη του περιβάλλοντος χώρου 22°C. Το pH ελεγχόταν σε ημερήσια βάση και κυμαινόταν από 7,6 έως 7,9..

Η μέτρηση του pH, της θερμοκρασίας και του οξυγόνου (Εικ.2α) πραγματοποιούνταν με πολύμετρο (HACH 40 Hd). Η μέτρηση της αλατότητας γίνονταν με αλατόμετρο (Εικ. 2β), ενώ η αμμωνία και τα νιτρώδη ιόντα μετρούνταν χρωματομετρικά με τεστ kit



Εικόνα 2. (α) Πολύμετρο για τη μέτρηση του pH, της θερμοκρασίας και του διαλυμένου οξυγόνου και (β) Αλατόμετρο για τη μέτρηση της αλατότητας στα πειραματικά ενυδρεία (Πηγή: Προσωπικό αρχείο).

### 2.3. Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε δύο μέρη (Εικ.4): το πρώτο αφορά στην εύρεση των ορίων αντοχής των γαριδών στην αμμωνία δια της μεταφοράς τους σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις της, και το δεύτερο αφορά στην εύρεση με παρόμοιο τρόπο των ορίων αντοχής των γαριδών στα νιτρώδη ιόντα, με τελικό σημείο και των δύο πειραμάτων το θάνατο των ψαριών (LC<sub>50</sub>). Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται η συγκέντρωση της αμμωνίας και των νιτρωδών ιόντων που επιφέρουν θάνατο στο 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 ωρών (24h-LC<sub>50</sub>).

Οι γαρίδες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προέρχονταν από το προαναφερθέντα εγκλιματισμένα ενυδρεία και μεταφέρονταν από τα ενυδρεία

εγκλιματισμού σε γυάλινα ενυδρεία των 5L (Πιν.1). Τα πειραματικά ενυδρεία περιείχαν 3 L θαλασσινό νερό αλατότητας 30 ppt. Η παροχή αέρα στα πειραματικά ενυδρεία γίνονταν από το κεντρικό σύστημα παροχής αέρα του εργαστηρίου ενώ η επιφάνεια των ενυδρείων καλυπτόταν με δίχτυ ώστε να μην πηδούν οι γαρίδες και υπάρξουν απώλειες στο πείραμα. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών (Πιν.2) προετοιμάζονταν από την προηγούμενη μέρα, όπου ζυγιζόταν η εκάστοτε επιθυμητή ποσότητα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ή  $\text{NaNO}_2$  σε ζύγο ακριβείας (AND-HR2000) (Εικ.4) και τοποθετούνταν σε αλουμινόχαρτο και κατόπιν διατηρούνταν στο ψυγείο.

Οι γαρίδες μεταφέρονταν στα πειραματικά ενυδρεία (Εικ.3) με απόχες αφού πρώτα τοποθετούνταν οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ή  $\text{NaNO}_2$  (ανάλογα το πείραμα) και μετά από 15 min σε κάθε ενυδρείο τοποθετούνταν 10 άτομα για αποφυγή συνωστισμού.



Εικόνα 3. Πειραματικά ενυδρεία με τις γαρίδες (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Σημειώνεται ότι οι γαρίδες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είχαν νηστέψει για 24 h για την αποφυγή περιττωμάτων τα οποία θα μετέβαλλαν την συγκέντρωση της αμμωνίας στα ενυδρεία.



Εικόνα 4. Ζυγός ακριβείας που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις των συγκεντρώσεων του  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και  $\text{NaNO}_2$  (Πηγή: Προσωπικό αρχείο).

Μετά την τοποθέτηση των γαρίδων στα πειραματικά ενυδρεία η φυσιολογική κατάσταση και η συμπεριφορά των γαρίδων παρακολουθούνταν συνεχώς. Τα πρώτα 10 min οι γαρίδες έδειχναν στρεσαρισμένες λόγω της μετακίνησής τους και είχαν έντονη κινητικότητα. Επίσης παρατηρήθηκε έντονη κινητικότητα προς τις άκρες των ενυδρείων. Μετά από αρκετές ώρες παρακολούθησης συνέχιζαν να δείχνουν ενοχλημένες και παρουσίαζαν ανοιχτό χρωματισμό. Οι πρώτοι θάνατοι παρατηρούνταν συνήθως μετά τη διέλευση 4-6 h και οι νεκρές και ετοιμοθάνατες γαρίδες απομακρύνονταν άμεσα από τα ενυδρεία με τη χρήση πλαστικής λαβίδας για να μην συνιστούσαν παράγοντα ρύπανσης στο νερό. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι στα πειραματικά ενυδρεία παρατηρήθηκαν μικρής έκτασης φαινόμενα κανιβαλισμού, τα οποία θεωρούνται αναμενόμενα λόγω της 24ωρης νηστείας.

Κατά το τέλος του 24 ωρου πειράματος λαμβανόταν δείγμα νερού σε ειδικούς πλαστικούς συλλεκτήρες και τοποθετούνταν στο ψυγείο για της μέτρηση της αμμωνίας TAN ή τη μέτρηση των νιτρωδών ιόντων αντίστοιχα. Οι ζωντανές γαρίδες μεταφέρονταν πολύ προσεκτικά στα ενυδρεία όπου τους παρείχετο τροφή, ενώ οι γαρίδες δεν ξαναχρησιμοποιούνταν σε άλλο πείραμα.

Πίνακας1. Βασικά στοιχεία της πειραματικής διαδικασίας.

<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ /ΔΟΧΕΙΟ</b>	<b>ΟΓΚΟΣ ΝΕΡΟΥ (L/ΕΝΥΔΡΕΙΟ)</b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>	<b>S (ppt)</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>						
<i>Palaemon adspersus</i>	0,40±0,02	10	3	7,7-7,9	22	30
<b>NaNO<sub>2</sub></b>						
<i>Palaemon adspersus</i>	0,40±0,02	10	3	7,7-7,9	22	30

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις μεταβολιτών (NH<sub>4</sub>Cl και NaNO<sub>2</sub>) που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της θνησογόνου συγκέντρωσης

NH <sub>4</sub> Cl (gr/L)	NaNO <sub>2</sub> (gr/L)
0,01	0,0001
0,02	0,0002
0,03	0,0004
0,04	0,0006
0,045	0,0008
0,05	0,001
0,06	0,003
0,08	0,005
0,1	0,007
0,2	0,008
0,3	0,009
0,4	0,01
0,5	0,02
1	0,03
1,4	0,04
1,75	0,05
2	0,07
2,15	0,08
2,25	0,1
2,5	0,15
2,75	0,2
3	0,3
3,25	0,4
=	0,5
=	0,7
=	0,9
=	1
=	1,5
=	2
=	3



## 2.4. Μεθοδολογία Έρευνας

Οι τιμές των  $LC_{50}$  καθώς και το τυπικό τους σφάλμα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο probit (Wardlaw 1989). Η τιμή του  $LC_{50}$  υπολογίστηκε με αντικατάσταση της τιμής 5 στο probit της θνησιμότητας στις εξισώσεις παλινδρόμησης probit θνησιμότητας-μεταβολίτη, οι οποίες αναγράφονται ενσωματωμένες στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις των Σχημάτων 1 και 2. .

Τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης των  $LC_{50}$ , υπολογίζονται χρησιμοποιώντας τον τύπο (Wardlaw 1989) :

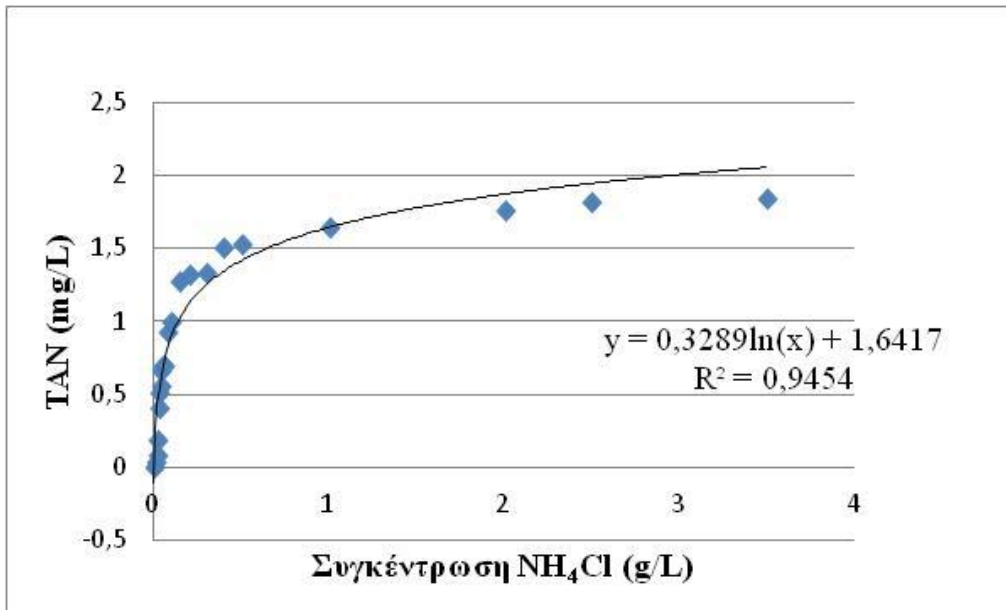
$$LC_{50} (95\% C.L.) = LC_{50} \pm 1.96 [SE(LC_{50})].$$

Τα τυπικά σφάλματα (SE) των  $LC_{50}$  υπολογίστηκαν με χρήση του τύπου :

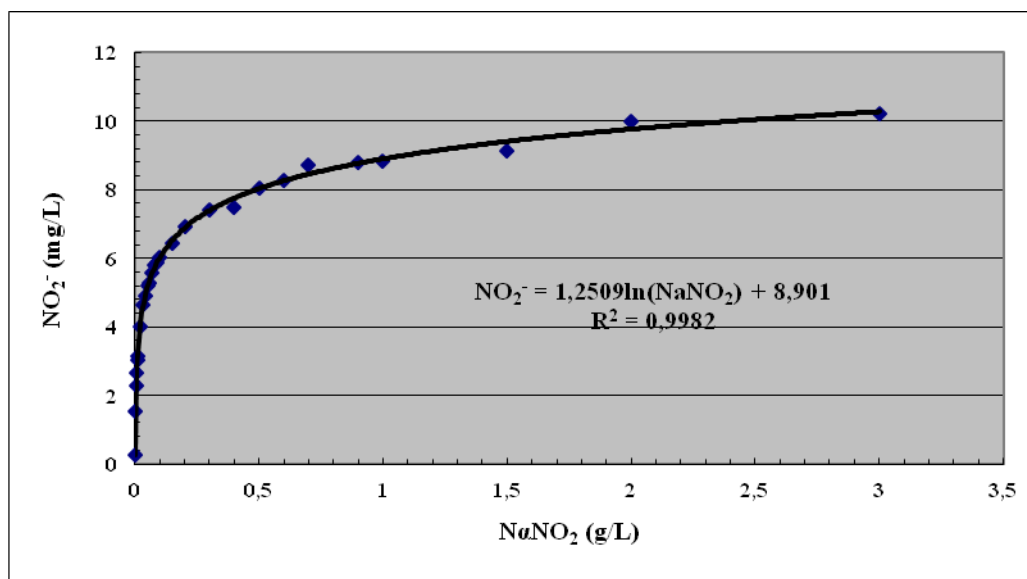
$$SE(LC_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pn\bar{w}}} \quad \text{όπου :}$$

- b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης probit θνησιμότητας – μεταβολίτη.
- p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του κάθε μεταβολίτη που χρησιμοποιήθηκαν (συμπεριλαμβανομένων και των συγκεντρώσεων που δεν χρησιμοποιήθηκαν στα διαγράμματα probit θνησιμότητας-μεταβολίτης). Ο αριθμός των συγκεντρώσεων αυτών είναι 12 για την ολική αμμωνία (TAN) και 30 όσο αφορά στα νιτρώδη ιόντα ( $NO_2^-$ ).
- n είναι ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μεταβολίτη και είναι ίσος με 10 άτομα γαρίδας, όσο αφορά και στους δύο μεταβολίτες.
- $\bar{w}$  είναι η μέση τιμή των συντελεστών βαρύτητας. Οι συντελεστές βαρύτητας προκύπτουν από τους πίνακες του παραρτήματος και η μέση τιμή τους αναγράφεται στους πίνακες ανάλυσης των probit.

Η εκάστοτε επιθυμητή συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας (TAN) ή των νιτρωδών ιόντων ( $NO_2^-$ ) επιτεύχθηκε μέσω της διάλυσης αλάτων χλωριούχου αμμωνίου ( $NH_4Cl$ ) και νιτρώδους νατρίου ( $NaNO_2$ ). Ανάλογα με τη διαλυόμενη ποσότητα τους στο νερό προέκυπτε και μια ορισμένη μετρήσιμη ποσότητα αμμωνίας ή νιτρωδών ιόντων. Οι εξισώσεις που συνδέουν την ποσότητα των διαλυμένων αλάτων και της αμμωνίας ή των νιτρωδών ιόντων σύμφωνα με τους Χώτο και συν (2001) παρουσιάζονται στα Σχήματα 1 και 2.



Σχήμα 1. Καμπύλη και εξίσωση της σχέσης του διαλυμένου  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και της προκύπτουσας συγκέντρωσης ολικής αμμωνίας (TAN).



Σχήμα 2. Καμπύλη και εξίσωση της σχέσης του διαλυμένου  $\text{NaNO}_2$  και της προκύπτουσας συγκέντρωσης  $\text{NO}_2^-$ .

## Κεφάλαιο 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

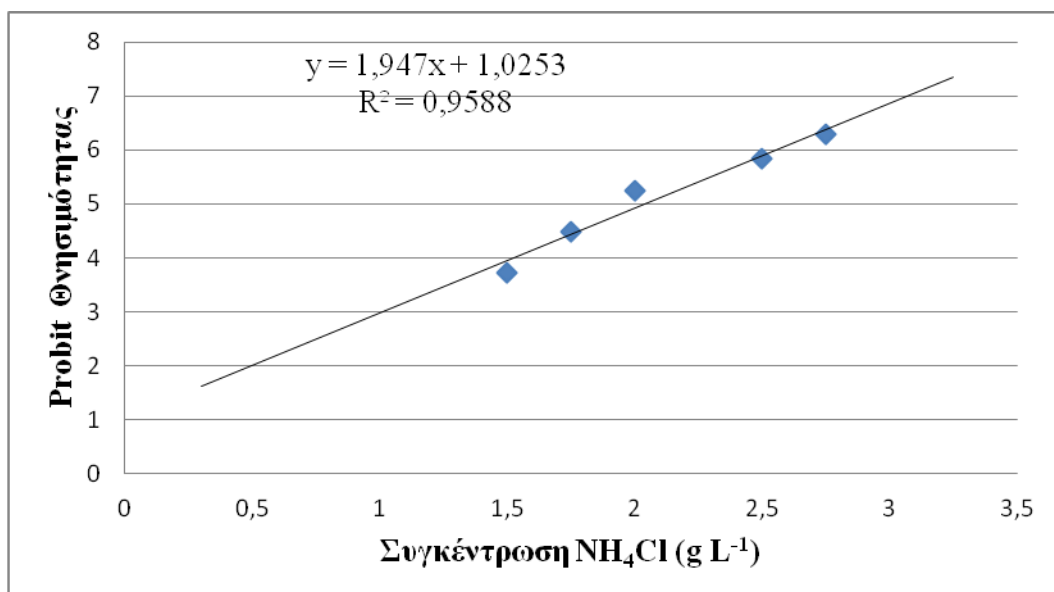
### 3.1. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την αντοχή της γαρίδας στην αμμωνία

Από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την ανάλυση τους με τη μέθοδο των probit (Wardlaw 1989) προέκυψε ο πίνακας 3 στον οποίο παρουσιάζονται αναλυτικά οι διάφορες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{CL}$  που χρησιμοποιήθηκαν, οι αναλογίες και τα ποσοστά της θνησιμότητας που επέφεραν οι συγκεντρώσεις αυτές, τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας, καθώς και τα αναμενόμενα probit και τέλος οι συντελεστές βαρύτητας  $w$  καθώς και το σύνολο τους  $\Sigma w$  και η μέση τιμή τους  $\bar{w}$ .

Πίνακας 3. Ανάλυση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του  $\text{NH}_4\text{CL}$  στη γαρίδα *Palaemon adspersus*.

Συγκέντρωση $\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	Αναλογία θνησιμότητας	Θνησιμότητα (%)	Probit Παρατηρούμενης θνησιμότητας	Αναμενόμενο probit	W
0,3	0/10	0		2	0,015
0,4	0/10	0		2	0,015
0,5	0/10	0		2	0,015
1	0/10	0		2,97	0,13
1,25	0/10	0		3,46	0,266
1,5	1/10	10	3,72	3,94	0,409
1,75	3/10	30	4,48	4,43	0,562
2	6/10	60	5,25	4,92	0,636
2,5	8/10	80	5,84	5,89	0,47
2,75	9/10	90	6,28	6,38	0,301
3	10/10	100		6,87	0,153
3,25	10/10	100		7,35	0,076
				$\bar{w}$	0,25
				$\Sigma W$	3,05

Το Σχήμα 3 παρουσιάζει την εξίσωση probit της θνησιμότητας για τις διάφορες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4\text{CL}$ .



Σχήμα 3. Ευθεία και εξίσωση probit για την θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NH<sub>4</sub>CL στη γαρίδα με βάση τις τιμές του Πίνακα 3.

Τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας υπολογίστηκαν από τον πίνακα 1 (παράρτημα Α), ενώ τα αναμενόμενα probit υπολογίζονται από την ευθεία παλινδρόμησης probit της θνησιμότητας-συγκέντρωση NH<sub>4</sub>CL, η οποία αναγράφεται ενσωματωμένη στο Σχήμα 3 ( $y=1,947x+1,0253$ ).

Αντικαθιστώντας στη θέση του αγνώστου  $x$  για την κάθε μία από τις συγκεντρώσεις του NH<sub>4</sub>CL του Πίνακα 3..

Η εύρεση των συντελεστών βαρύτητας  $w$  πραγματοποιήθηκε από τον πίνακα 2 (παράρτημα Α), με βάση τις προκύπτουσες τιμές των αναμενόμενων probit.

Ο υπολογισμός του 24h-LC<sub>50</sub> (δηλαδή η συγκέντρωση του NH<sub>4</sub>CL που θανατώνει το 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 h), αντικαθιστώντας την τιμή 5 στο  $y$  της ευθείας παλινδρόμησης. Δηλαδή:

$$y=1,947x+1,0253$$

$$5=1,947x+1,0253$$

$$5-1,0253=1,947x$$

$$3,9747=1,947x$$

$$x=2,0414$$

Άρα, **24h-LC<sub>50</sub> NH<sub>4</sub>CL= 2,04 g/L**

Για να υπολογιστεί το 24h-LC<sub>50</sub> της αμμωνίας που προκύπτει από τη διάλυση στο νερό του NH<sub>4</sub>CL χρησιμοποιούμε την εξίσωση του Σχήματος 1.

TAN (mg/L)=0,3289lnx+1,6417 . Έτσι έχουμε :

$$24\text{h-LC}_{50} \text{ TAN(mg/L)}=0,3289\ln 2,04+1,6417=1,8752$$

Άρα προκύπτει ότι **24h-LC<sub>50</sub> TAN=1,87 mg/L**

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα 95% όρια εμπιστοσύνης ( $\pm 95\% \text{C.L.}$ ) του 24h-LC<sub>50</sub> με χρήση του τύπου  $SE(\text{LC}_{50}) = \frac{1}{b \cdot \sqrt{p+n \cdot w}}$

Όπου :

b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης του Σχήματος 3., με τιμή 1,947

p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του NH<sub>4</sub>CL που χρησιμοποιήθηκαν

(12)

n είναι ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση

(10)

και  $\bar{w}$  είναι η τιμή των συντελεστών βαρύτητας .Με αντικατάσταση των τιμών αυτών στον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι  $SE(\text{LC}_{50})=0,093$ . Πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με 1,96 προκύπτει ότι

$$24\text{h-LC}_{50} (\pm 95 \% \text{ C.L.})=2,04 \pm 0,182 \text{ (g/L NH}_4\text{CL)}.$$

### 3,2. Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την αντοχή της γαρίδας στα νιτρώδη ιόντα

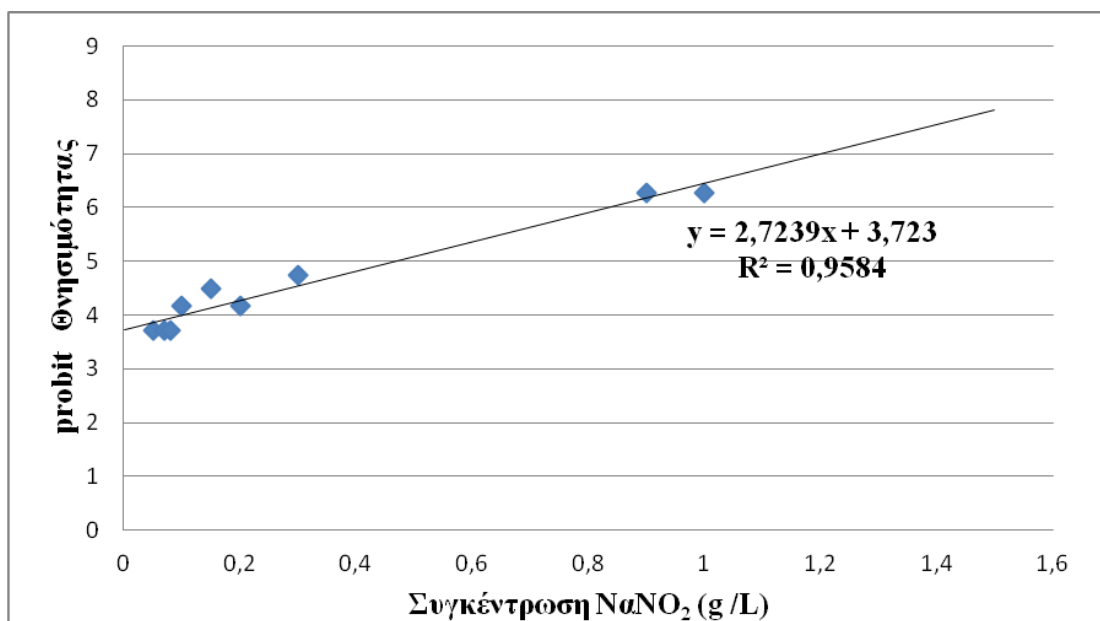
Από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την ανάλυση τους με τη μέθοδο των probit (Wardlaw 1989), προέκυψε ο Πίνακας 4 στον οποίο παρουσιάζονται αναλυτικά οι διάφορες συγκεντρώσεις NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, που χρησιμοποιήθηκαν.

Οι αναλογίες και τα ποσοστά της θνησιμότητας που επέφεραν οι συγκεντρώσεις αυτές, τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας, καθώς και τα αναμενόμενα probit και τέλος ο συντελεστής βαρύτητας w καθώς και το σύνολο τους Σw και η μέση τιμή τους  $\bar{w}$ .

Πίνακας 4. Ανάλυση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NaNO<sub>2</sub> στη γαρίδα *Palaemon adspersus*.

Συγκέντρωση NaNO <sub>2</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Αναλογία θνησιμότητας	Θνησιμότητα %	Probit παρατηρούμενης θνησιμότητας	Αναμενόμενο probit	W
0,0001	0/10	0		3,72	0,338
0,0002	0/10	0		3,72	0,338
0,0004	0/10	0		3,72	0,338
0,0006	0/10	0		3,72	0,338
0,0008	0/10	0		3,73	0,339
0,001	0/10	0		3,73	0,339
0,003	0/10	0		3,73	0,339
0,005	0/10	0		3,74	0,34
0,007	0/10	0		3,74	0,34
0,008	0/10	0		3,74	0,34
0,009	0/10	0		3,75	0,34
0,01	0/10	0		3,75	0,34
0,02	0/10	0		3,78	0,368
0,03	0/10	0		3,80	0,37
0,04	0/10	0		3,83	0,373
0,05	1/10	10	3,72	3,86	0,401
0,07	1/10	10	3,72	3,91	0,406
0,08	0/10	10	3,72	3,94	0,409
0,1	2/10	20	4,16	4,00	0,439
0,15	3/10	30	4,48	4,13	0,474
0,2	2/10	20	4,16	4,27	0,528
0,3	4/10	40	4,75	4,54	0,586
0,9	9/10	90	6,28	6,17	0,368
1	9/10	90	6,28	6,45	0,304
1,5	10/10	100		7,81	0,025
				$\bar{w}$	0,36
				$\Sigma W$	9,12

Το Σχήμα 4 παρουσιάζει την εξίσωση probit της θνησιμότητας για τις διάφορες συγκεντρώσεις NaNO<sub>2</sub>.



Σχήμα 4. Ευθεία και εξίσωση probit για την θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NaNO<sub>2</sub> στη γαρίδα με βάση τις τιμές του Πίνακα 4

Τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας υπολογίστηκαν από τον πίνακα 1 (παράρτημα Α), ενώ τα αναμενόμενα probit υπολογίζονται από την ευθεία παλινδρόμησης probit της θνησιμότητας-συγκέντρωση NaNO<sub>2</sub> η οποία αναγράφεται ενσωματωμένη στο Σχήμα 4 ( $y=2,7239 \cdot x+3,723$ ).

Η εύρεση των συντελεστών βαρύτητας  $w$  πραγματοποιήθηκε από τον πίνακα 3 (παράρτημα Α), με βάση τις προκύπτουσες τιμές των αναμενόμενων probit.

Ο υπολογισμός του 24h-LC<sub>50</sub> (δηλαδή η συγκέντρωση του NaNO<sub>2</sub> που θανατώνει το 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 h, αντικαθιστώντας την τιμή 5 στο  $y$  της ευθείας παλινδρόμησης. Δηλαδή:

$$y=2,7239x+3,723$$

$$5=2,7239x+3,723$$

$$5-3,723=2,7239x$$

$$X=1,277/2,7239$$

$$X=0,47 \text{ g/L}$$

**Άρα, 24h-LC<sub>50</sub> NaNO<sub>2</sub>= 0,47 g/L**

Για να υπολογιστεί το 24h-LC<sub>50</sub> των νιτρωδών που προκύπτει από τη διάλυση στο νερό του NaNO<sub>2</sub> χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Σχήματος 2.

$\text{NO}_2^- \text{ (mg/L)} = 1,2509(\ln(\text{g/L NaNO}_2)) + 8,901$  Έτσι έχουμε :

$24\text{h-LC}_{50} \text{ NO}_2^- \text{ (mg/L)} = 1,2509 * \ln(0,47) + 8,901$

Άρα προκύπτει ότι  **$24\text{h-LC}_{50} \text{ NO}_2^- = 7,96 \text{ mg/L}$**

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα 95% όρια εμπιστοσύνης ( $\pm 95 \% \text{ C.L.}$ ) του

$$24\text{h-LC}_{50} \text{ με χρήση του τύπου } SE(\text{LC}_{50}) = \frac{1}{b \cdot \sqrt{p \cdot n \cdot w}}$$

Όπου :

- $b$  είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης του Σχήματος 2, με τιμή 2,7239
- $p$  είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του  $\text{NaNO}_2$  που χρησιμοποιήθηκαν (25)
- $n$  είναι ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση (10)

και  $\bar{w}$  είναι η τιμή των συντελεστών βαρύτητας.

Με αντικατάσταση των τιμών αυτών στον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι  $SE(\text{LC}_{50}) = 0,039$ . Πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με 1,96 προκύπτει ότι

**$24\text{h-LC}_{50} (\pm 95 \% \text{ C.L.}) = 0,47 \pm 0,076 \text{ (g/L NaNO}_2 \text{)}$**



## Κεφάλαιο 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σκοπιμότητα των πειραμάτων τοξικότητας στην αμμωνία και στα νιτρώδη ιόντα χρησιμοποιείται ως κριτήριο αξιολόγησης της ποιότητας των προνυμφών στα περισσότερα είδη γαρίδων. Επίσης τα πειράματα τοξικότητας αναφέρονται στην απόκριση ενός οργανισμού σε μια ενεργή βιολογική ουσία και είναι χρήσιμα στο να προσδιορίζουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού (Pandari Reddy *et al.* 2016).

Παράγοντες όπως η ηλικία, το μέγεθος, η αλατότητα και το pH επηρεάζουν την ποιότητα των προνυμφών στις γαρίδες και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Η επίδραση της τοξικότητας της αμμωνίας και των νιτρωδών ιόντων στην επιβίωση της γαρίδας *Palaemon adspersus* μελετάται για πρώτη φορά.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η 24 h - LC50 τιμή για την αμμωνία βρέθηκε να είναι 1,87 mg/L. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα εργασία παρατηρείται ότι η γαρίδα *Palaemon adspersus* φαίνεται να είναι περισσότερο ανθεκτική στα νιτρώδη ιόντα σε σχέση με την αμμωνία.

Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας συμφωνούν με εκείνα των Chen & Lei (1990) οι οποίοι μελέτησαν τη γαρίδα *P. monodon* και βρήκαν ότι η 24h θνησιγόνος συγκέντρωση για την αμμωνία είναι 1,76 mg/L. Επίσης οι Chin & Chen (1987) μελέτησαν το είδος *P.monodon* στο στάδιο της μύσιδος και βρήκαν ότι η 24h-LC50 θνησιγόνος συγκέντρωση για την αμμωνία ήταν αντίστοιχα 2,17 mg/L.

Οι αποκλίσεις και διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις διάφορες μελέτες όσο αφορά στις θανατηφόρες συγκεντρώσεις της αμμωνίας και των νιτρωδών και στις τιμές των LC<sub>50</sub>, οφείλονται σε διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των νιτρωδών ιόντων.

Στη παρούσα εργασία σε ότι αφορά στα νιτρώδη ιόντα η 24h-LC50 βρέθηκε να είναι 7,96 mg/L. Οι Chen & Lei (1990) μελέτησαν την τοξικότητα της γαρίδας *P.monodon* στα νιτρώδη ιόντα και βρήκαν ότι η 24h LC50 είναι 218 mg/L. Η μεγαλύτερη τιμή του 24h-LC<sub>50</sub> για τη γαρίδα της παρούσας εργασίας, σε σχέση με την τιμή που βρήκαν οι Chen & Lei (1990), μπορεί να δικαιολογηθεί εξαιτίας της χαμηλότερης θερμοκρασίας και του υψηλότερου pH, συνθήκες που αμβλύνουν την τοξικότητα των νιτρωδών.

Επίσης οι τιμές αυτές υποδηλώνουν ότι ο ρυθμός θνησιμότητας εξαρτάται από την συγκέντρωση και τον χρόνο έκθεσης της γαρίδας στην αμμωνία και αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας. Αυτό κυρίως οφείλεται στη συσσώρευση της χημικής ουσίας (μεταβολίτη) σε επικίνδυνα επίπεδα που οδηγεί στο θάνατο. Ένας άλλος παράγοντας που προκαλεί θάνατο και θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η βλάβη που προκαλείται στα βράγχια των γαρίδων από την αμμωνία και τα νιτρώδη ιόντα (Khangarot 1982, Nilkaht & Sawant 1993).

Έχει βρεθεί ότι υπάρχει μια θετική σχέση μεταξύ της θνησιμότητας και των επιπέδων της συγκέντρωσης του μεταβολίτη (αμμωνία και νιτρώδη ιόντα). Όταν η συγκέντρωση του μεταβολίτη αυξάνει τότε αυξάνει και ο ρυθμός θνησιμότητας. Οι Witeska & Jeezierska (2003) βρήκαν ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία, η αλκαλικότητα, η αμμωνία, τα νιτρώδη ιόντα καθώς και η παρουσία άλλων μετάλλων στο νερό επηρεάζουν τα επίπεδα τοξικότητας στους οργανισμούς.

Εντούτοις υπάρχει και αρνητική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου θνησιμότητας και της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Όταν η συγκέντρωση αυξάνει ο χρόνος που συμβαίνει η θνησιμότητα μειώνεται.

Συμπερασματικά λοιπόν, η αμμωνία και τα νιτρώδη ιόντα είναι ιδιαίτερα τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς, αν και η άμεση σύγκριση της τοξικότητας τους όπως αυτή προκύπτει από τις διάφορες μελέτες, δεν είναι εφικτή, εξαιτίας της πολύπλοκης δράσης που ασκούν οι διάφοροι περιβαλλοντικοί και βιολογικοί παράγοντες στην τοξικότητα της αμμωνίας και των νιτρωδών ιόντων.

## Κεφάλαιο 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Alabaster ,J.S . &Lloyd. R. (1980). Ammonia .In : J.S Alabaster and R. Lloyd (editors). Water quality Criteria for Freshwater Fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations , Butterworths, London , pp. 85-102.
- Alcaraz, G. &. Espina, S., (1997). Scope for Growth of Juvenile Grass Carp *Ctenopharyngodon idella* Exposed to Nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.* 116, 85-88.
- Arellano, E. (1990). Fatty acid composition of wild and cultured *Penaeus vannamei* as a method to evaluate postlarval quality. In: Abstracts of the World Aquaculture Society Meeting. National Research Council Canada, Ottawa, p. 50.
- Armstrong, D.A.. &.D. Chippendale & A.W. knight & J.E .Colt. (1978). Interaction of ionized and unionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae , *Macrobrachium rassenbergii*.*Biol.bull.* 154 :15-31
- Bauman, R.H. &Jamandre, D.R. (1990). A practical method for determining quality of *Penaeus monodon* (Fabricius) fry for stocking in grow-out ponds. In: New, M.,
- Saram, H., Singh, T. (Eds.), Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming. Proceedings of the Aquatech 90 Conference. Infofish, Kuala Lumpur, pp. 124–131. –70.
- Boyd,C.F. Romaine Protection Agency.,(1983). Water quality criteria for the protection of aquatic life and its uses : Ammonia .Final Draft. Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory , Duluth, MN. (Kinne, O. (Ed.). *Marine Ecology*, vol. III, part 1. Wiley-Interscience, New York pp. 79–300.
- Briggs, M.R.P. (1992).A stress test for determining vigour of post-larval *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Fish. Manage.* 23, 633–637H
- Browdy, C. (1992).A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, World Aquaculture Society Meeting.
- Chen ,J.C. & Lei,S.C. (1990).Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles.*J. World Aquacult. Soc* ,21 (4):300-306
- Chin, T.S & Chen ,J.C. (1987) . Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn ,*Penaeus monodon*, *Aquaculture* ,66 :247-253

- Emerson, K. & Russo, R.C. & Lund, E.R. & Thurston, R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32, 2379–2383.
- FAO., (1998). Annual Fertilizer Review. World Wide Web page address: <http://www.fao.org/>. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Ital
- Fegan, D. (1992). Recent developments and issues in the penaeid shrimp hatchery industry. In: Wyban, J. (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, World Aquaculture Society Meeting*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 55
- Floyd, R. (1961). Effect of dissolved oxygen concentration on the toxicity of several poisons to rainbowtrout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Exp. Biol.* 38: 447-455
- Hickey CW. & Ratherford JC, (1986). Agricultural point- source discharges and their effects on rivers. *NZ Ag Sci* 20:104-109.
- Jiann-Chu Chen & Tzong-Shean Chin. (1987). Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon*, larvae. Department of Aquaculture, National Taiwan College of Marine Science and Technology, Keelung 20224 Twiwan
- Khengarot BS (1982). Histopathological changes in the branchial apparatus of *Punctius sopore* (Ham.) subjected to toxic doses of Zinc. *Arch. Hydrobiol.* 93:352-358
- Krom, M.D. & J. van Rijn. (1989). Water quality processes in fish culture system; processes, problems and possible solutions. In N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors and N. Wilkins, eds., *Aquaculture-A Bio- technology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 1091-1111.
- Little, E.E. & Delonay, A.J. (1996). Measures of fish behaviour as indicators of sublethal toxicosis during standard toxicology tests. In: La Point, T.W., Price F.T., Little, E.E., ed. *Environmental toxicology and risk assessment*. Vol. 4 American Society for Testing and Materials Pp 216-233
- Macquart. & Moulin C. (1997) : Locomotory responses and tolerance of larval and postlarval sole (*Solea solea* L.) to low oxygen concentrations. *Marine and Freshwater Behaviours and Physiology* 30:55-74
- Nilkant GV, Sawant KB (1993). Studies on accumulation and Histopathology of gills after exposure to sublethal concentration of Hexavalent chromium and effect on the oxygen consumption in *Scylla serrata* (Forsk.). *Poll. Res.* 12(1):11-18.
- Pandari Reddy, P., Jagadeshwarlu, R., Sunitha Devi, G. (2016). Determination of lethal concentration (LC50) of copper to *Sarotherodon mossambica*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 4(1): 172-175.
- Passano, L. M. (1960). Molting and its control. In T. Waterman, ed., *Physiology of Crustacea*. Academic Press, New York, NY, pp 473-536

- Regnault, M. (1987). Nitrogen excretion in marine and fresh water crustacean. Biol. REV.,62:1-24
- Saram, H., Singh, T. (Eds.), Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming. Proceedings of the Aquatech 90 Conference. Infofish, Kuala Lumpur, pp. 124–131. –70.
- Samocha, T.M. &Guajardo, H. &Lawrence, A.L. & Castille, F.L. & Speed, M. &McKee, D.A. &Page, K.I.(1998) A simple stress test for *Penaeus 6 annamei* postlarvae. Aquaculture 165, 233-242.
- Schuler D.J., Boardman G.B., Kuhn D.D. & Flick. J.G. (2010).Acute toxicity of ammonia and Nitrite to Pacific White Shrimp,*Litopenaeus vannamei*,at Low Salinities.
- Serafy, J.E. & Havrell, R.M. (1993) :Behavioural response of fishes to increasing ph and dissolved oxygen : field and laboratory observations.Freshwater Biology 30:53-61
- Singh, I.S.B. &Philip, R. (1995).A simple device for the separation of weak larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquacult. Res. 26, 225–227.
- Tackaert, W. &Abelin, P. &Le´ger, P. &Sorgeloos, P. (1989) Stress resistance as a criterium to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures. In: Proceedings III Simpo´sio Brasileiro sobre Cultivo de Camaraõ. Joaõ Pessoa, Brazil, pp. 393–403.
- Thurston , R.V. &R.C. Pusso & G.A. Vinogradov. (1981).Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the unionized ammonia species.Environ.Sci.Technol 15 : 837-840
- Tomasso, J.R. (1994). Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. Rev. Fish. Sci. 2, 291–314.,
- Trussel , R.P. (1972).Thepercent un-ionised ammonia in aqueous ammonia solutions at different PH levels and temperatures. J. Fish. Res. Board Can , Ottawa , Canada 310 pp.
- Wajsborn, N., & Gasith, A., & Krom, M.D. & Popper, D.M., (1991).Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. Aquaculture 92, 277-288.
- Wajsborn , N. (1987). Nitrogen budget and ammonia toxicity to juvenile shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan. M. Sc. Thesis . Tel-Aviv University, Tel Aviv Israel. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 22–51.
- Wardlaw., C.A. (1989). Practical Statistics for Experimental Biologists. 3<sup>rd</sup> Edition by John Willey & Sons Publications. Pp. 107-110.
- Watanabe, T. & Kitajima, C. &Fujita, S.(1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture 34, 115–143.

Whitfield M., (1978). The hydrolysis of ammonium ion in the sea water – experimental confirmation of predicted constants at one atmosphere pressure. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 58:781-787.

Witeska M, Jezierska B. The effect of environmental factors on metal toxicity of fish. Fresen. Environ. Bull, 2003; 12:824-9.

Wickins, J.F. (1976). The tolerance of warm water prawns to recirculated water. Aquaculture 9:19-37

### ***Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία***

Παπουτσόγλου, Σ., (1997). Εισαγωγή στις υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Σταμούλης, σελ.100-120.

Χώτος, Γ., Βλάχος, Ν. και Αβραμίδου, Δ., (2001). Μελέτη του μεταβολισμού και καθορισμός ασφαλών ορίων των κυριότερων από τα εκτρεφόμενα είδη ψαριών στην Ελλάδα. Μεσολόγγι, 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων, σσ. 50-73.

## Abstract

The present study was conducted to evaluate the acute toxicity of total ammonia and nitrite ion to *Palaemon adspersus* prawn by static bioassays. The Mediterranean shrimp, *Palaemon adspersus*, is a potential species of the Messolonghi lagoon in Western Greece. The experimental process was based on mortality rates, and the median lethal concentration for 50% of the population (LC<sub>50</sub>) was estimated by probit analysis.

Each trial include 10 individually postlarvae (25-45 days old) of *Palaemon adspersus*. The average weight and length were used in the experimental were 0,40±0,02 g and 3,2 ± 0,02 cm, respectively. The prawns were exposed to a wide range of NH<sub>4</sub>Cl concentrations of 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,15, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0 and 3,25 g/L at 30 ppt salinity, 22° C and a pH of 7,8. Also in a different experiment *Palaemon adspersus* was exposed to a wide range concentration of NaNO<sub>2</sub> (0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0004, 0,0006, 0,0008, 0,001, 0,003, 0,005, 0,007,0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,07,0,08,0,1, 0,2,0,3,0,4,0,5,0,7,0,9,1,0,1,5, 2 and 3,0 g/L) at the same salinity, temperature and pH. All the exposed *P.adspersus* was daily observed and dead prawns were removed immediately. The mortality was recorded on daily basis.

The results shows that the 24 h -LC<sub>50</sub> value for total ammonia and nitrite ion were found to be 1,87 mg/L and 7,96 mg/L respectively. Also, the results suggest that further studies needs to do and observe the processes by which these chemicals affect haematological and biochemical changes of the prawn. Also needs to investigate the combined effects of ammonia and nitrite at varying concentrations at lower salinities and will be important in developing “standard operating procedures” for the shrimp industry.

**Key Words:** Toxicity test of total ammonia, Toxicity test of nitrite ions, *Palaemon adspersus*, LC<sub>50</sub>.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α**

**Πίνακας 1. Probit που αντιστοιχεί στα δεκαδικά ποσοστού θνησιμότητας**

Μονάδες ποσοστού	Probit που αντιστοιχεί στα δεκαδικά ποσοστού.									
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0		1.9098	2.1218	2.2522	2.3479	2.4242	2.4879	2.5427	2.5911	2.6344
1	2.6737	2.7096	2.7429	2.7738	2.8027	2.8299	2.8556	2.8799	2.9031	2.9251
2	2.9463	2.9665	2.9859	3.0046	3.0226	3.0400	3.0569	3.0732	3.0890	3.1043
3	3.1192	3.1337	3.1478	3.1616	3.1750	3.1881	3.2009	3.2134	3.2256	3.2376
4	3.2493	3.2608	3.2721	3.2831	3.2940	3.3046	3.3151	3.3253	3.3354	3.3454
5	3.3551	3.3648	3.3742	3.3836	3.3928	3.4018	3.4107	3.4195	3.4282	3.4368
6	3.4452	3.4536	3.4618	3.4699	3.4780	3.4859	3.4937	3.5015	3.5091	3.5167
7	3.5242	3.5316	3.5389	3.5462	3.5534	3.5605	3.5675	3.5742	3.5813	3.5882
8	3.5949	3.6016	3.6083	3.6148	3.6213	3.6278	3.6342	3.6405	3.6468	3.6531
9	3.6592	3.6654	3.6715	3.6775	3.6835	3.6894	3.6953	3.7012	3.7070	3.7127
10	3.7184	3.7241	3.7298	3.7354	3.7409	3.7464	3.7519	3.7574	3.7628	3.7681
11	3.7735	3.7788	3.7840	3.7893	3.7945	3.7996	3.8048	3.8099	3.8150	3.8200
12	3.8250	3.8300	3.8350	3.8399	3.8448	3.8497	3.8545	3.8593	3.8641	3.8689
13	3.8736	3.8783	3.8830	3.8877	3.8923	3.8969	3.9015	3.9061	3.9107	3.9152
14	3.9197	3.9242	3.9286	3.9331	3.9375	3.9419	3.9463	3.9506	3.9550	3.9593
15	3.9636	3.9678	3.9721	3.9763	3.9806	3.9848	3.9890	3.9931	3.9973	4.0014
16	4.0055	4.0096	4.0137	4.0178	4.0218	4.0259	4.0299	4.0339	4.0379	4.0419
17	4.0458	4.0498	4.0537	4.0576	4.0615	4.0654	4.0693	4.0731	4.0770	4.0808
18	4.0846	4.0884	4.0922	4.0960	4.0998	4.1035	4.1073	4.1110	4.1147	4.1184
19	4.1221	4.1258	4.1295	4.1331	4.1367	4.1404	4.1440	3.3476	4.1512	4.1548
20	4.1584	4.1619	4.1655	4.1690	4.1726	4.1761	4.1796	4.1831	4.1866	4.1901
21	4.1936	4.1970	4.2005	4.2039	4.2074	4.2108	4.2042	4.2176	4.2210	4.2244
22	4.2278	4.2312	4.2345	4.2379	4.2412	4.2446	4.2479	4.2512	4.2546	4.2579
23	4.2612	4.2644	4.2677	4.2710	4.2743	4.2775	4.2808	4.2840	4.2872	4.2905
24	4.2937	4.2969	4.3001	4.3033	4.3065	4.3097	4.3129	4.3160	4.3192	4.3324
25	4.3255	4.3287	4.3318	4.3349	4.3380	4.3412	4.3443	4.3474	4.3505	4.3536
26	4.3567	4.3597	4.3628	4.3659	4.3689	4.3720	4.3750	4.3781	4.3811	4.3842
27	4.3872	4.3902	4.3932	4.3962	4.3992	4.4052	4.4052	4.4082	4.4112	4.4142
28	4.4172	4.4201	4.4231	4.4260	4.4290	4.4349	4.4349	4.4378	4.4408	4.4437
29	4.4466	4.4495	4.4524	4.4554	4.4583	4.4641	4.4641	4.4670	4.4698	4.4727
30	4.4756	4.4785	4.4813	4.4842	4.4871	4.4928	4.4928	4.4956	4.4985	4.5013
31	4.5041	4.5070	4.5098	4.5126	4.5155	4.5211	4.5211	4.5239	4.5267	4.5295
32	4.5323	4.5351	4.5379	4.5407	4.5435	4.5490	4.5490	4.5518	4.5546	4.5573
33	4.5601	4.5628	4.5656	4.5684	4.5711	4.5766	4.5766	4.5793	4.5821	4.5848
34	4.5875	4.5903	4.5930	4.5957	4.5984	4.6039	4.6039	4.6066	4.6093	4.6120
35	4.6147	4.6174	4.6201	4.6228	4.6255	4.6308	4.6308	4.6335	4.6362	4.6389
36	4.6415	4.6442	4.6469	4.6495	4.6522	4.6575	4.6575	4.6602	4.6628	4.6695
37	4.6681	4.6708	4.6734	4.6761	4.6787	4.6840	4.6840	4.6866	4.6893	4.6919
38	4.6945	4.6971	4.6998	4.7024	4.7050	4.7102	4.7102	4.7129	4.7155	4.7181
39	4.7207	4.7233	4.7259	4.7285	4.7311	4.7337	4.7363	4.7389	4.7415	7.7441
40	4.7467	4.7492	4.7518	4.7544	4.7570	4.7596	4.7622	4.7647	4.7673	4.7699
41	4.7725	4.7750	4.7776	4.7802	4.7828	4.7853	4.7879	4.7904	4.7930	4.7955
42	4.7981	4.8007	4.8032	4.8058	4.8083	4.8109	4.8134	4.8160	4.8185	4.8211
43	4.8236	4.8262	4.8287	4.8313	4.8338	4.8363	4.8389	4.8414	4.8440	4.8465
44	4.8490	4.8516	4.8541	4.8566	4.8592	4.8617	4.8642	4.8668	4.8693	4.8718
45	4.8743	4.8769	4.8794	4.8819	4.8844	4.8870	4.8895	4.8920	4.8945	4.8970
46	4.8696	4.9021	4.9046	4.9071	4.9096	4.9122	4.9147	4.9172	4.9197	4.9222
47	4.9247	4.9272	4.9298	4.9323	4.9348	4.9373	4.9398	4.9423	4.9448	4.9473
48	4.9498	4.9524	4.9549	4.9574	5.9599	4.9624	4.9649	4.9674	4.9699	4.9724
49	4.9747	4.9774	4.9799	4.9825	4.9850	4.9875	4.9900	4.9925	4.9950	4.9975
50	5.0000	5.0025	5.0050	5.0075	5.0100	5.0125	5.0150	5.0175	5.0201	5.0226



51	5.0251	5.0276	5.0301	5.0326	5.0351	5.0376	5.0401	5.0426	5.0451	5.0476
52	5.0502	5.0527	5.0552	5.0577	5.0602	5.0627	5.0652	5.0677	5.0702	5.0728
53	5.0753	5.0778	5.0803	5.0828	5.0853	5.0878	5.0409	5.0929	5.0954	5.0979
54	5.1004	5.1030	5.1055	5.1080	5.1105	5.1130	5.1156	5.1181	5.1206	5.1231
55	5.1257	5.1282	5.1307	5.1332	5.1358	5.1383	5.1408	5.1434	5.1459	5.1484
56	5.1510	5.1535	5.1560	5.1586	5.1611	5.1637	5.1662	5.1687	5.1713	5.1738
57	5.1764	5.1789	5.1815	5.1840	5.1866	5.1891	5.1917	5.1942	5.1968	5.1993
58	5.2019	5.2045	5.2070	5.2096	5.2121	5.2147	5.2173	5.2198	5.2224	5.2250
59	5.2275	5.2301	5.2327	5.2353	5.2378	5.2404	5.2430	5.2456	5.2482	5.2508
60	5.2533	5.2559	5.2585	5.2611	5.2637	5.2663	5.2689	5.2715	5.2741	5.2767
61	5.2793	5.2819	5.2845	5.2871	5.2898	5.2924	5.2950	5.2976	5.3002	5.3029
62	5.3055	5.3081	5.3107	5.3134	5.3160	5.3186	5.3213	5.3239	5.3266	5.3292
63	5.3319	5.3345	5.3372	5.3398	5.3425	5.3451	5.3475	5.3505	5.3531	5.3558
64	5.3585	5.3614	5.3638	5.3665	5.3692	5.3719	5.3745	5.3772	5.3799	5.3826
65	5.3853	5.3880	5.3907	5.3004	5.3961	5.3989	5.4016	5.4043	5.4070	5.4097
66	5.4125	5.4112	5.4179	5.4207	5.4234	5.4261	5.4289	5.4316	5.4344	5.4372
67	5.4399	5.4427	5.4454	5.4482	5.4510	5.4538	5.4546	5.4593	5.4621	5.4649
68	5.4677	4.4705	5.4733	5.4761	5.4789	5.4817	5.4845	5.4874	5.4902	5.4930
69	5.4959	5.4987	5.5015	5.5044	5.5072	5.5101	5.5129	5.5158	5.5187	5.5215
70	5.5244	5.5273	5.5302	5.5330	5.5359	5.5388	5.5417	5.5446	5.5486	5.5505
71	5.5534	5.5563	5.5592	5.5622	5.5651	5.5681	5.5710	5.5740	5.5769	5.5799
72	5.5828	5.5858	5.5888	5.5918	5.5948	5.5978	5.6008	5.6038	5.6068	5.6098
73	5.6128	5.6158	5.6189	5.6219	5.6250	5.6280	5.6311	5.6341	5.6372	5.6403
74	5.6433	5.6464	5.6495	5.6526	5.6557	5.6588	5.6620	5.6651	5.6682	5.6713
75	5.6745	5.6776	5.6808	5.6840	5.6871	5.6903	5.6935	5.6967	5.6999	5.7031
76	5.7063	5.7095	5.7128	5.7160	5.7192	5.7225	5.7257	5.7290	5.7323	5.7356
77	5.7388	5.7421	5.7454	5.7488	5.7521	5.7554	5.7588	5.7621	5.7655	5.7688
78	5.7722	5.7756	5.7790	5.7824	5.7858	5.7892	5.7926	5.7961	5.7995	5.8030
79	5.8064	5.8099	5.8134	5.8169	5.8204	5.8239	5.8274	5.8310	5.8345	5.8381
80	5.8416	5.8542	5.8488	5.8524	5.8560	5.8596	5.8633	5.8669	5.8705	5.8742
81	5.8779	5.8816	5.8853	5.8890	5.8927	5.8965	5.9002	5.9040	5.9078	5.9116
82	5.9154	5.9192	5.9230	5.9269	5.9307	5.9346	5.9385	5.5424	5.9463	5.9502
83	5.9542	5.9581	5.9621	5.9661	5.9701	5.9741	5.9782	5.9822	5.9863	5.9904
84	5.9945	5.9986	6.0027	6.0069	6.0110	6.0115	6.0194	6.0237	6.0279	6.0322
85	6.0364	6.0407	6.0450	6.0494	6.0537	6.0581	6.0625	6.0669	6.0714	6.0758
86	6.0803	6.0848	6.0993	6.0939	6.0985	6.1031	6.1077	6.1123	6.1170	6.1217
87	6.1264	6.1311	6.1359	6.1407	6.1455	6.1503	6.1552	6.1601	6.1650	6.1700
88	6.1750	6.1800	6.1850	6.1901	6.1952	6.2004	6.2055	6.2107	6.2160	6.2212
89	6.2265	6.2319	6.2372	6.2426	6.2481	6.2536	6.2591	6.2646	6.2702	6.2759
90	6.2816	6.2873	6.2930	6.2988	6.3047	6.3106	6.3165	6.3225	6.3285	6.3346
91	6.3408	6.3469	6.3532	6.3595	6.3658	6.3722	6.3787	6.3852	6.3917	6.3984
92	6.4051	6.4118	6.4187	6.4255	6.4325	6.4395	6.4466	6.4538	6.4611	6.4684
93	6.4758	6.4833	6.4909	6.4985	6.5063	6.5141	6.5220	6.5301	6.5382	6.5464
94	6.5548	6.5632	6.5718	6.5805	6.5893	6.5892	6.6072	6.6164	6.6258	6.6352
95	6.6449	6.6546	6.6646	6.6747	6.6849	6.6954	6.7060	6.7169	6.7279	6.7392
96	6.7507	6.7624	6.7744	6.7866	6.7991	6.8119	6.8250	6.8384	6.8522	6.8663
97	6.8808	6.8975	6.9110	6.9268	6.9431	6.9600	6.9774	6.9954	7.0141	7.0335
98.0	7.0537	7.0558	7.0579	7.0600	7.0621	7.0642	7.0663	7.0684	7.0706	7.0727
98.1	7.0749	7.0770	7.0792	7.0814	7.0836	7.0858	7.0880	7.0902	7.0924	7.0947
98.2	7.0969	7.0992	7.1015	7.1038	7.1061	7.1084	7.1107	7.1130	7.1154	7.1177
98.3	7.1201	7.1224	7.1248	7.1272	7.1297	7.1321	7.1345	7.1370	7.1394	7.1419
98.4	7.1444	7.1469	7.1494	7.1520	7.1545	7.1571	7.1596	7.1622	7.1648	7.1675
98.5	7.1701	7.1727	7.1754	7.1781	7.1808	7.1835	7.1862	7.1890	7.1917	7.1945
98.6	7.1973	7.2001	7.2029	7.2058	7.2086	7.2115	7.2144	7.2173	7.2203	7.2232
98.7	7.2262	7.2292	7.2322	7.2353	7.2383	7.2414	7.2445	7.2476	7.2508	7.2539
98.8	7.2571	7.2603	7.2636	7.2668	7.2701	7.2734	7.2768	7.2801	7.2835	7.2869
98.9	7.2904	7.2938	7.2973	7.3009	7.3044	7.3080	7.3116	7.3152	7.3189	7.3226
99.0	7.3263	7.3301	7.3339	7.3378	7.3416	7.3455	7.3495	7.3535	7.3585	7.3615

99.1	7.3656	7.3698	7.3739	7.3181	7.3824	7.3867	7.3911	7.3954	7.3999	7.4044
99.2	7.4089	7.4135	7.4181	7.4228	7.4276	7.4324	7.4372	7.4422	7.4471	7.4522
99.3	7.4573	7.4624	7.4677	7.4730	7.4783	7.4838	7.4893	7.4949	7.5006	7.5063
99.4	7.5121	7.5181	7.5241	7.5302	7.5364	7.3427	7.9451	7.5556	7.5622	7.5690
99.5	7.5758	7.5828	7.5899	7.5972	7.6045	7.6121	7.6197	7.6276	7.6356	7.6437
99.6	7.6521	7.6606	7.6693	7.6783	7.6874	7.6968	7.7065	7.7164	7.7266	7.7370
99.7	7.7478	7.7589	7.7703	7.7822	7.7944	7.8070	7.8202	7.8338	7.8480	7.8627
99.8	7.8782	7.8943	7.9112	7.9290	7.9478	7.9677	7.9889	8.0115	8.0357	8.0618
99.9	8.0902	8.1214	8.1559	8.1947	8.2398	8.2905	8.3528	8.4316	8.5401	8.7190

Πίνακας 2. Συντελεστής βαρύτητας για το αναμενόμενο probit

**ANAMENOMENO PROBIT ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ**

2.0 ή 8.0	0.015
2.1 7.9	0.019
2.2 7.8	0.025
2.3 7.7	0.031
2.4 7.6	0.040
2.5 ή 7.5	0.050
2.6 7.4	0.062
2.7 7.3	0.076
2.8 7.2	0.092
2.9 7.1	0.110
3.0 ή 7.0	0.131
3.1 6.9	0.154
3.2 6.8	0.180
3.3 6.7	0.208
3.4 6.6	0.237
3.5 ή 6.5	0.269
3.6 6.4	0.302
3.7 6.3	0.336
3.8 6.2	0.370
3.9 6.1	0.405
4.0 ή 6.0	0.439
4.1 5.9	0.471
4.2 5.8	0.503
4.3 5.7	0.532
4.4 5.6	0.558
4.5 ή 5.5	0.581
4.6 5.4	0.601
4.7 5.3	0.616
4.8 5.2	0.627
4.9 5.1	0.634
5.0	0.637