

Περιβαλλοντική και Διατροφική Τοξικολογία

Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Τοξικολογία
Εργαστηριακοί μέθοδοι εκτίμησης τοξικότητας

Δημήτρης Καρπούζας



Τοξικότητα

Το σύνολο των ανεπιθύμητων επιδράσεων μιας ξενοβιοτικής ουσίας σε οργανισμούς μη-στόχους **(υπάρχουν και τα γεωργικά φάρμακα!!!)**

Αναφέρεται σε όλους τους οργανισμούς και όχι μόνο στους ανώτερους



Η επιστήμη που εξετάζει τις τοξικές επιδράσεις ξеноβιοτικών μορίων σε όλους τους οργανισμούς που βρίσκονται στο περιβάλλον ονομάζεται **Οικοτοξικολογία (Ecotoxicology)** ή **Περιβαλλοντική Τοξικολογία (Environmental Toxicology)**



Κατηγορίες Τοξικότητας

- Οξεία τοξικότητα (Acute toxicity)
- Χρόνια τοξικότητα (chronic toxicity)



Οξεία Τοξικότητα

- Δυσμενείς επιδράσεις εμφανίζονται αμέσως μετά την επαφή του οργανισμού με μια μόνο δόση της ξενοβιοτικής ουσίας
- Είναι αναστρέψιμη
- Οφείλεται συνήθως στην αναστολή λειτουργίας ενός φυσιολογικού συστήματος του οργανισμού και μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά (LD_{50} , LC_{50} , ED_{50} , EC_{50})



Οξεία Τοξικότητα

LD₅₀ (Lethal Dose): Η ποσότητα μιας ξενοβιοτικής ουσίας που μπορεί να θανατώσει το 50% ενός τυχαία επιλεγμένου πληθυσμού ενός συγκεκριμένου οργανισμού και εκφράζεται ως mg ουσίας/kg σωματικού βάρους του υπό εξέταση οργανισμού



Οξεία Τοξικότητα – LD₅₀

Πλεονεκτήματα:

Αφαιρεί τον παράγοντα σωματικό βάρος

Μειονεκτήματα:

1. Δεν λαμβάνει υπόψη την παραλακτικότητα μεταξύ ατόμων του ίδιου οργανισμού λόγω ηλικίας ή λόγω φύλλου
2. Παρέχει στοιχεία για πειραματικά κυρίως είδη και μόνο ενδείξεις τοξικότητας σε άνθρωπο και κτηνοτροφικά είδη

Λοιπές Παράμετροι Προσδιορισμού Οξείας Τοξικότητας

LC₅₀ (Lethal Concentration): Η συγκέντρωση μιας ξενοβιοτικής ουσίας στον περιβάλλοντα αέρα ή νερό που περιβάλλει τους οργανισμούς ικανή να προκαλέσει το θάνατο του 50% του πληθυσμού

Για μέτρηση τοξικότητας σε ψάρια ή οργανισμούς που έχουν εισπνεύσει ατμούς δηλητηρίων. Εξαρτάται από το χρονικό διάστημα επαφής της ουσίας με τον οργανισμό



Λοιπές Παράμετροι Προσδιορισμού Οξείας Τοξικότητας

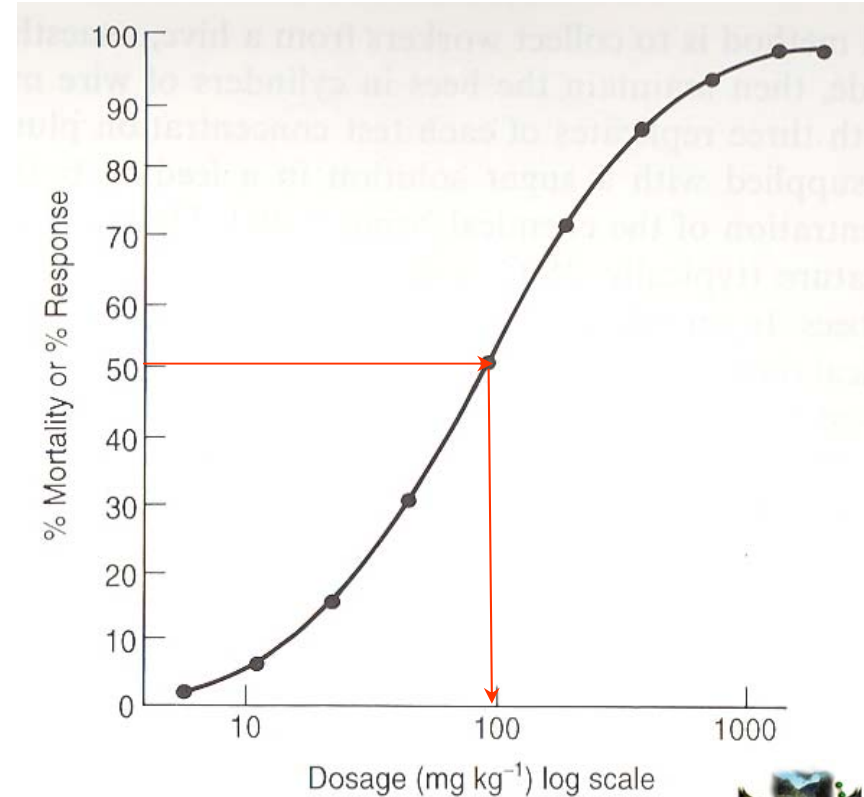
ED₅₀ ή EC₅₀ (Effective Dose): χρησιμοποιούνται όταν σαν κριτήριο τοξικότητας δεν λαμβάνεται ο θάνατος του οργανισμού αλλά άλλο αξιολογήσιμο στοιχείο από τον βιολογικό κύκλο του υπό εξέταση είδους **(Ποια?)**

- Αναστολή ανάπτυξης (φύκη, υδροχαρή φυτά)
- Ακινητοποίηση (*Daphnia magna*)
- Αδυναμία αναπαραγωγής (*Daphnia magna*)



Προσδιορισμός LD₅₀

Πληθυσμός του υπό εξέταση οργανισμού έρχεται σε επαφή με διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας και το ποσοστό των ατόμων που πεθαίνουν καταγράφεται και τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος περιγράφονται από σιγμοειδή καμπύλη



Οξεία Τοξικότητα - Τιμές

$LD_{50} < 1 \text{ mg/kg}$

Πάρα πολύ τοξικές

$1 < LD_{50} < 50 \text{ mg/kg}$

Πολύ τοξικές

$50 < LD_{50} < 500 \text{ mg/kg}$

Μετρίως τοξικές

$500 < LD_{50} < 5000 \text{ mg/kg}$

Ελαφρώς τοξικές



Οξεία τοξικότητα LD₅₀ (mg/kg) διαφόρων δραστικών ουσιών σε άρρενα ποντίκια

Εντομοκτόνα	LD₅₀	Μυκητοκτόνα	LD₅₀	Ζιζανιοκτόνα	LD₅₀
Parathion	5	Benomyl	100	Paraquat	112
Coumaphos	100	Tridemorph	650	MCPA	700
DDT	250	Βορδιγάλειος Πολτός	700	Linuron	1500
Carbaryl	400	Quintozene	1650	Glyphosate	4320
Pyrethrin	570	Carboxin	3200	Bromacil	5000
Malathion	1400	Captan	9000	Dalapon	6600

Χρόνια Τοξικότητα

- Δυσμενείς επιδράσεις εμφανίζονται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα ως αποτέλεσμα της επαναλαμβανόμενης επαφής ενός οργανισμού με μικρές και μη θανατηφόρες δόσεις μιας ξενοβιοτικής ουσίας
- Μη αναστρέψιμη
- Εμφανίζεται με την μορφή
 - **ορμονικών διαταραχών**
 - **καρκινογένεσης ή τερατογένεσης**
 - **μεταλλαξιγένεσης**



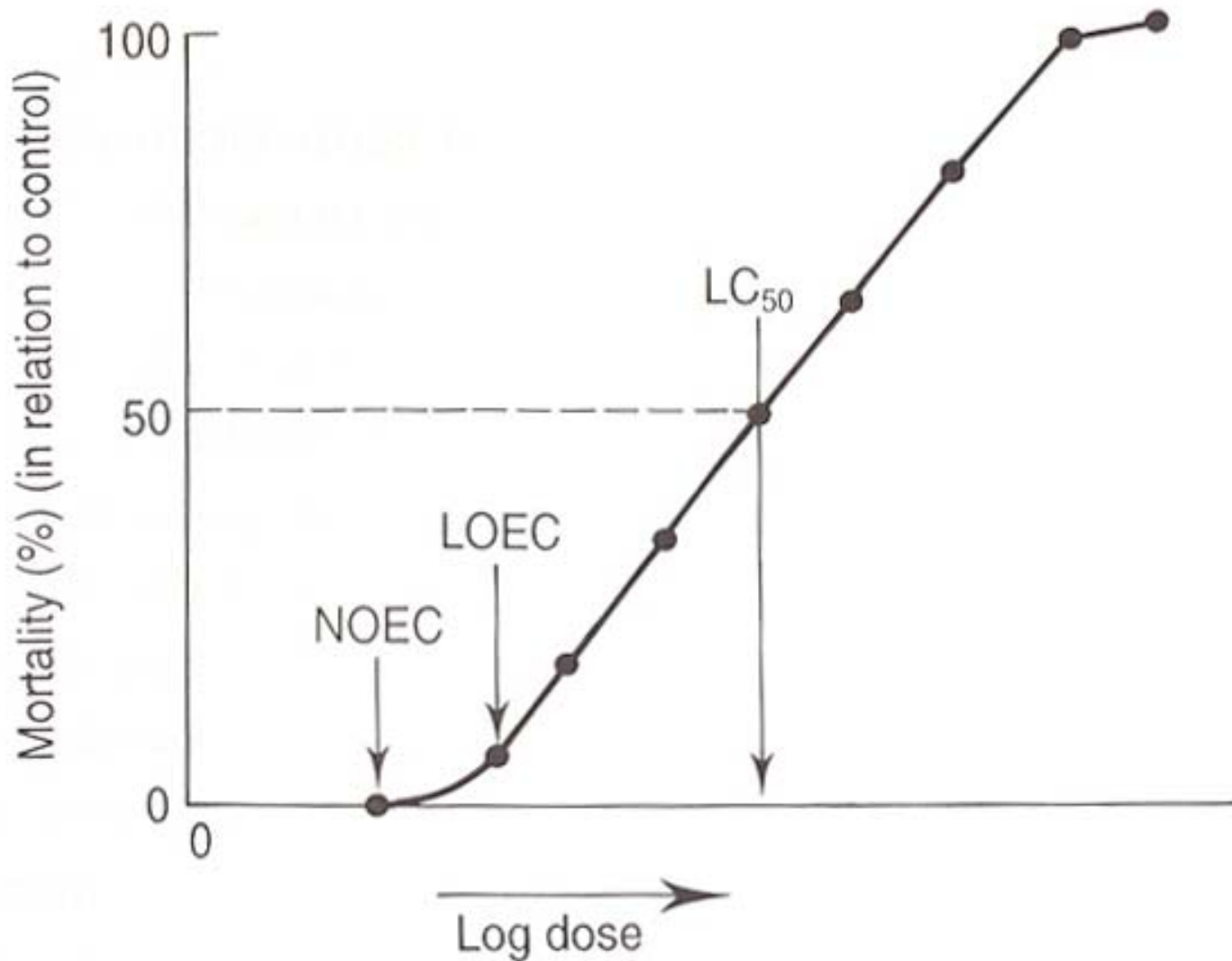
Προσδιορισμός Χρόνιας Τοξικότητας

Πληθυσμός ενός οργανισμού τρέφεται για χρονικό διάστημα με ποικιλία συγκεντρώσεων του φαρμάκου και η υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα στο υπό εξέταση είδος ονομάζεται **Non Observed Effect Concentration (NOEC mg/kg σωμ. βαρ./ημέρα)**

Η χαμηλότερη ημερήσια δόση που προκαλεί συμπτώματα τοξικότητας στο υπό εξέταση είδος ονομάζεται αντίστοιχα **Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)**



Προσδιορισμός Χρόνιας Τοξικότητας



Μέθοδοι Παρακολούθησης στην Περιβαλλοντική Τοξικολογία

(έμφαση στους υδρόβιους οργανισμούς)



Επίπεδα Παρακολούθησης Τοξικότητας

- Εργαστηρίου
- Ανοικτού Πεδίου

Στο εργαστήριο οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες και προσαρμοσμένες ενώ στο ανοικτό πεδίο όχι



Παρακολούθηση Τοξικότητας σε Επίπεδο Εργαστηρίου

- Απλά και εύκολα στον χειρισμό πειράματα
- Χαμηλό κόστος και απαιτήσεις σε εξοπλισμό
- Ύπαρξη λεπτομερών πειραματικών πρωτοκόλλων που περιγράφουν πλήρως και με κάθε λεπτομέρεια τα διάφορα στάδια του πειραματισμού



Παρακολούθηση Τοξικότητας σε Επίπεδο Εργαστηρίου

➤ Τεστ Τοξικότητας Ενός Οργανισμού (Single-Species

Tests): περιλαμβάνουν έλεγχο της τοξικότητας μιας

ουσίας σε ένα μόνο είδος οργανισμού σε αυστηρά

ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηρίου



Single Species Test - Προβλήματα

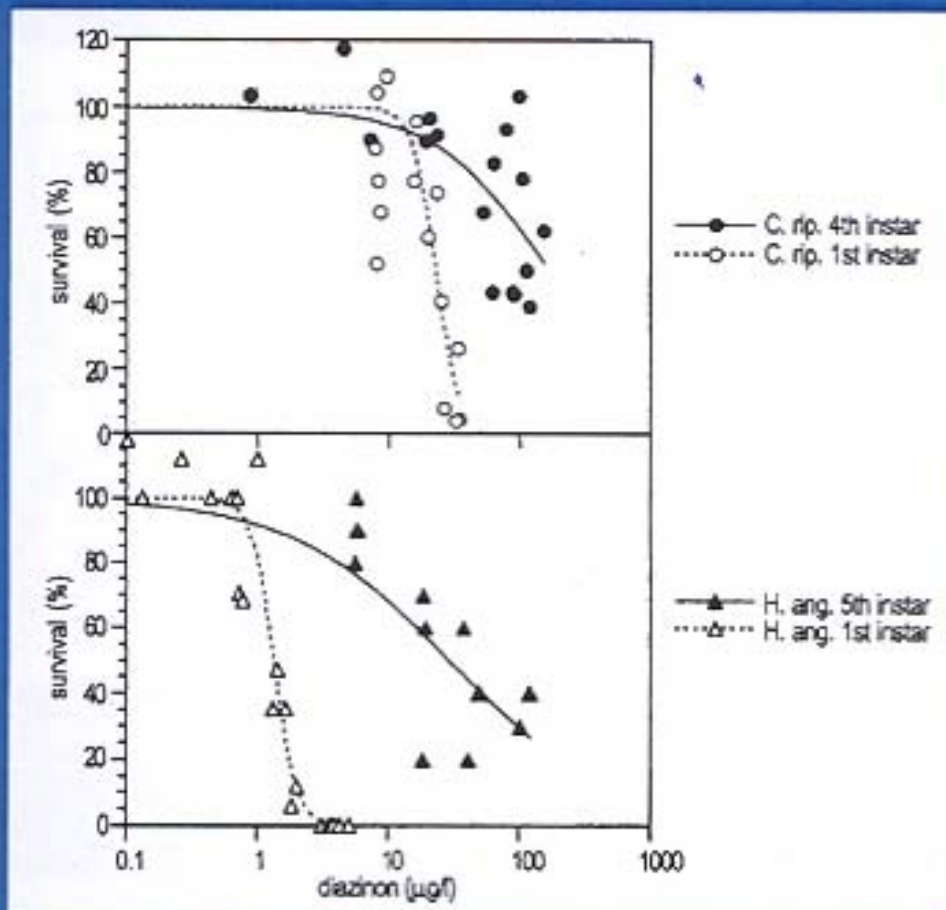
Το βασικό πρόβλημα των SST είναι ότι αντικατοπτρίζουν πάντα worst-case scenarios με ιδιαίτερα συντηρητικές παραδοχές **(Γιατί αποδεχόμαστε ότι είμαστε υπερβολικοί?)**

Προτιμότερο να είσαι, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια αξιολόγησης του κινδύνου, υπέρ του δέοντος προστατευτικός για το περιβάλλον και όχι τόσο ρεαλιστής!



Single Species Test – Συντηρητικές Παραδοχές

Χρήση σταδίων του βιολογικού κύκλου που είναι τα πιο ευαίσθητα **(Μόνο αυτά υπάρχουν στο περιβάλλον?)**



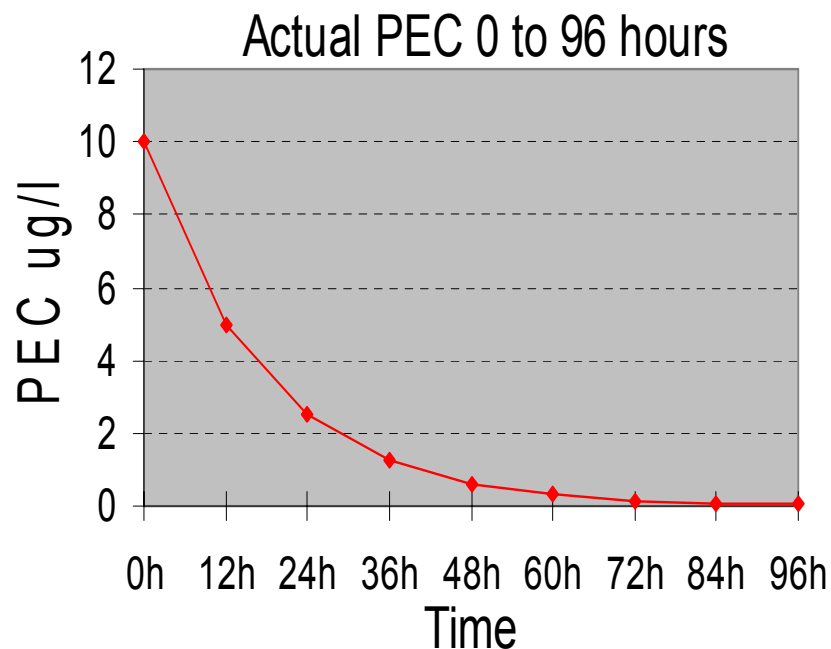
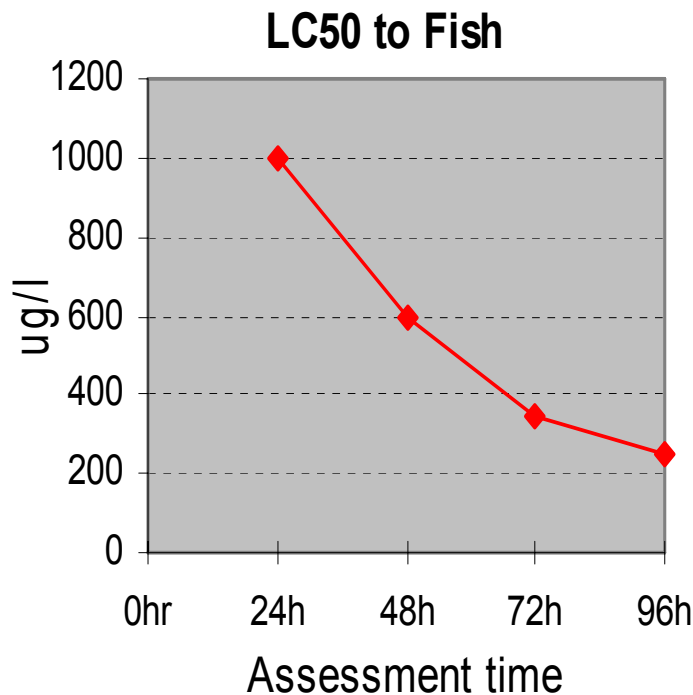
Chironomus riparius

Hydropsyche angustipennis

Stuijzand 99

Single Species Test – Συντηρητικές Παραδοχές

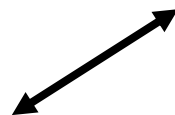
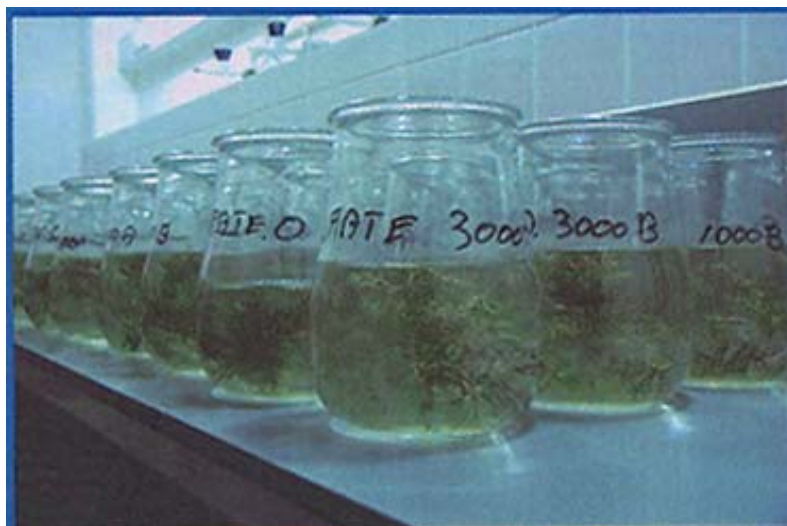
Τα άτομα του υπό εξέταση οργανισμού εκτίθενται σε όλη την διάρκεια του τεστ σε σταθερές συγκεντρώσεις της ουσίας **(Τι γίνεται σε δυναμικά υδροφόρα συστήματα?)**



Single Species Test – Συντηρητικές Παραδοχές

Τα άτομα του υπό εξέταση οργανισμού εκτίθενται πλήρως

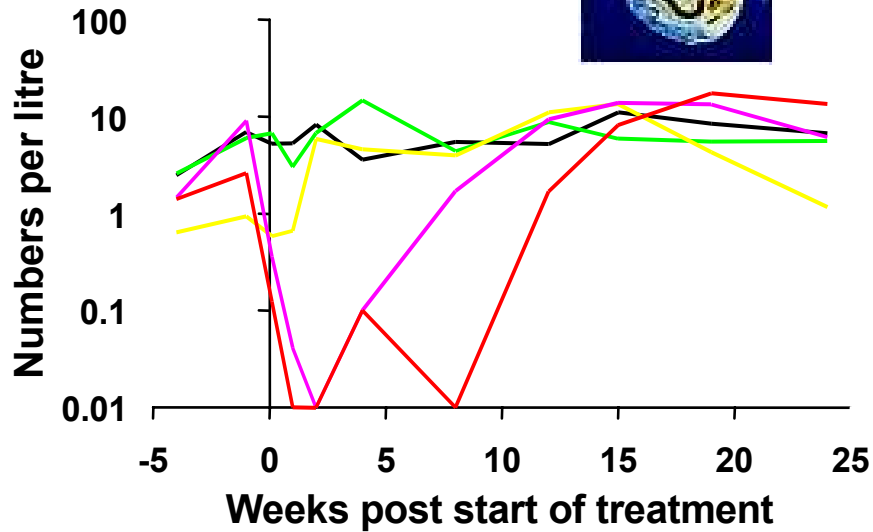
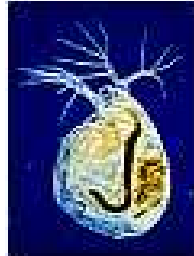
(Δεν υπάρχουν σημεία να προστατευτούν?)



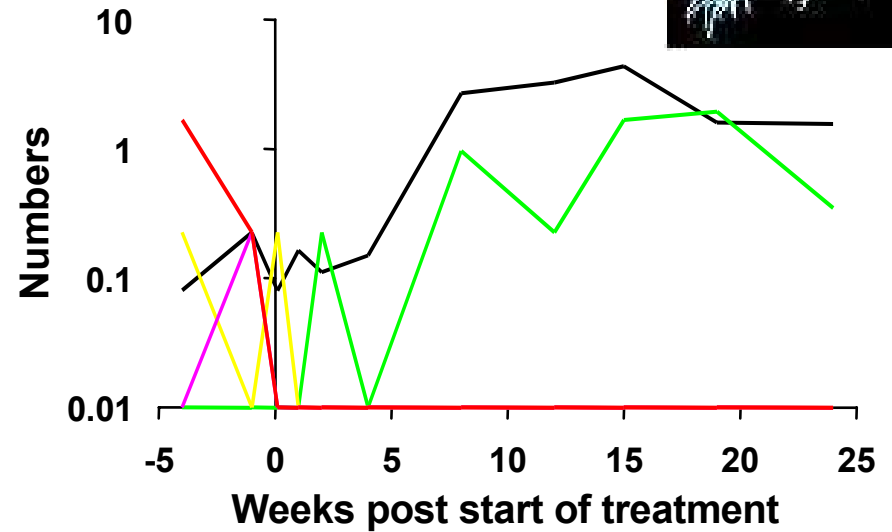
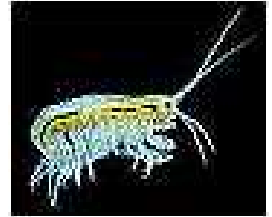
Single Species Test – Συντηρητικές Παραδοχές

Δεν δίνεται η δυνατότητα και δεν παρατηρείται πιθανή ανάκαμψη (recovery) του πληθυσμού

Simocephalus vetulus
(EC50= 0.4 µg/L)



Gammarus pulex
(EC50= 0.08 µg/L)

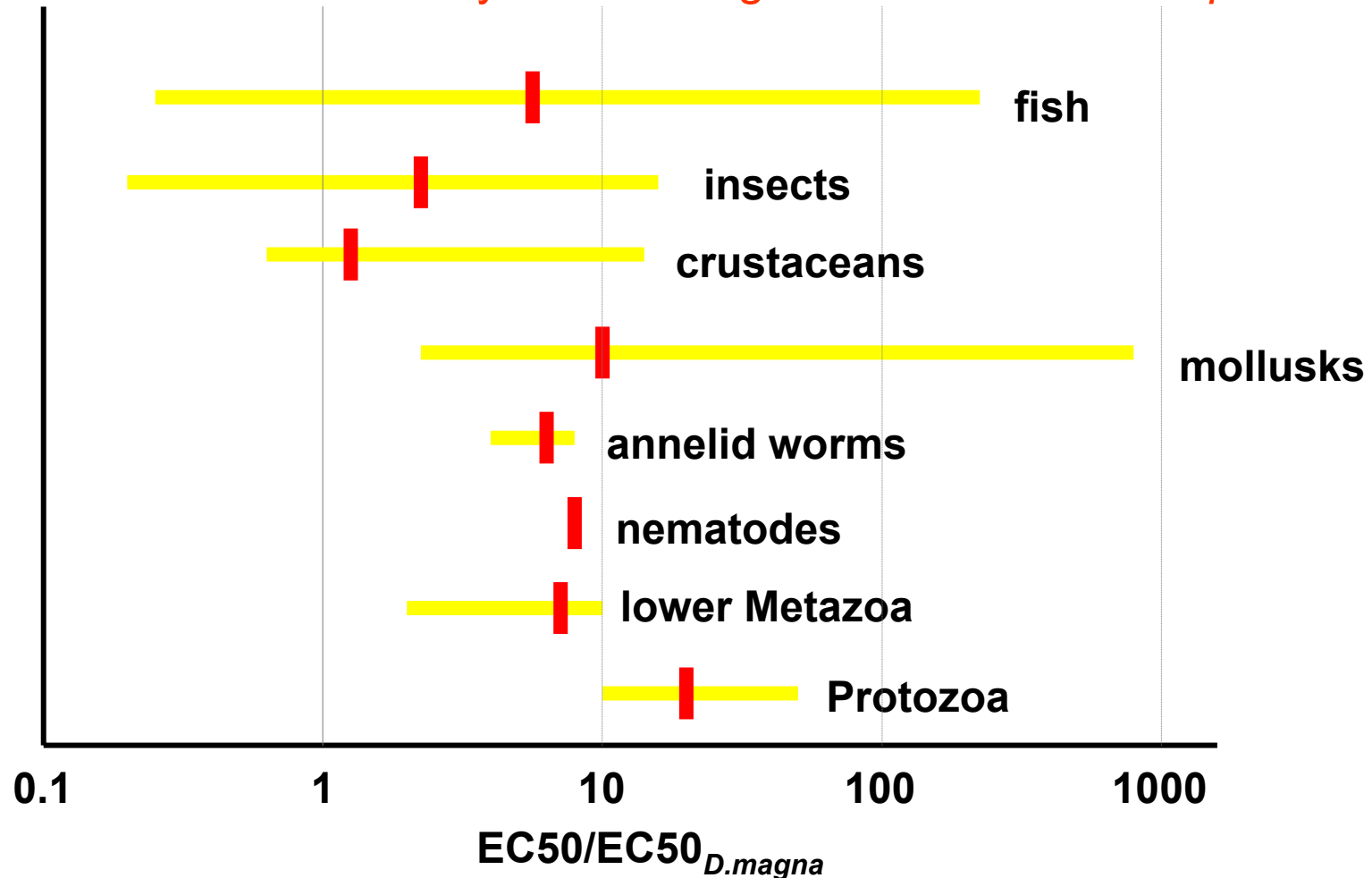


— Control — 0.1 µg/L — 0.9 µg/L — 6 µg/L — 44 µg/L — Control — 0.1 µg/L — 0.9 µg/L — 6 µg/L — 44 µg/L

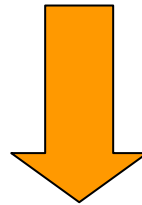
Single Species Test – Συντηρητικές Παραδοχές

Τα είδη που χρησιμοποιούνται συνήθως ως αντιπροσωπευτικά ομάδων οργανισμών (ασπόνδυλα, σπονδυλωτά) δεν είναι πάντα τα πιο ευαίσθητα

Insecticides and sensitivity of water organisms relative to *Daphnia magna*



Πως μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τα δεδομένα από εργαστηριακά τεστ (SSTs) για να προβλέψουμε με μεγαλύτερο ρεαλισμό και λιγότερη αβεβαιότητα την τοξικότητα μιας ουσίας?



Με την χρήση πιο προχωρημένων στατιστικών μοντέλων όπως είναι η **Κατανομή Ευαισθησίας Ειδών (Species Sensitivity Distributions)**



Κατανομές Ευαισθησίας Ειδών

(Species Sensitivity Distribution)



Τι είναι οι κατανομές ευαισθησίας ειδών?

Στατιστικές κατανομές που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την **παραλλακτικότητα** και **αβεβαιότητα** στην αξιολόγηση της τοξικότητας μιας ουσίας όταν αυτή στηρίζεται σε δεδομένα εργαστηρίου (SSTs) και εξάγουμε συμπεράσματα ότι το ίδιο συμβαίνει και στα φυσικά οικοσυστήματα



Παραλλακτικότητα (Variation)

Η ποικιλία των παραγόντων που επηρεάζουν την τελική επίδραση μιας ουσίας

- Η τοξικότητα διαφέρει μεταξύ ειδών του ίδιου οργανισμού
- Η τοξικότητα διαφέρει σε επίπεδο χρόνου και τόπου

Αβεβαιότητα (Uncertainty)

Προκύπτει από την περιορισμένη γνώση σχετικά με παράγοντες που επηρεάζουν την επίδραση μιας ουσίας

- Υποθετικός προσδιορισμός της τοξικότητας σε επίπεδο οικοσυστήματος βασιζόμενοι σε παρατηρήσεις εργαστηρίου

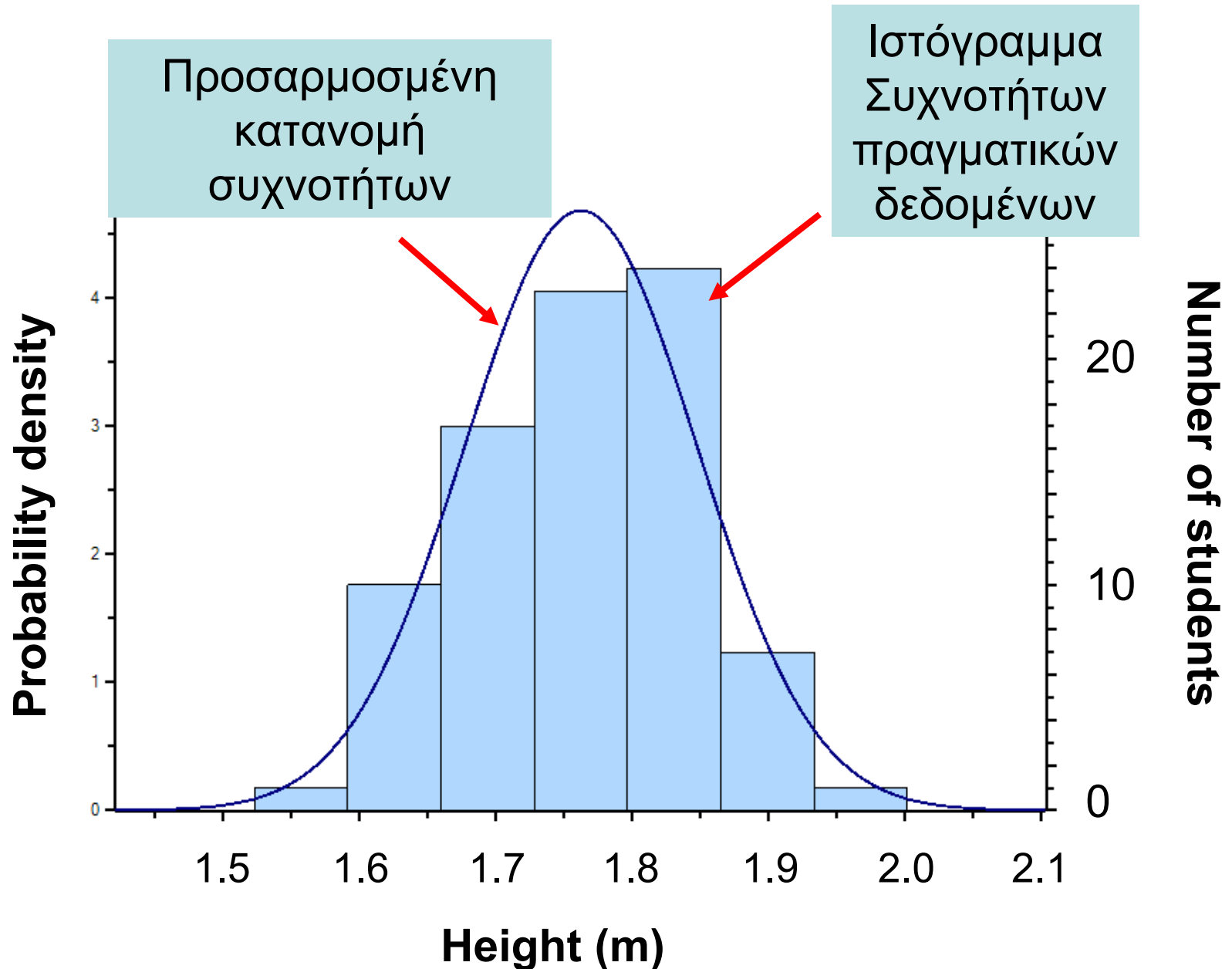
Παράδειγμα κατασκευής Κατανομής Ευαισθησίας Ειδών

Τα ύψη των φοιτητών στο τρίτο έτος

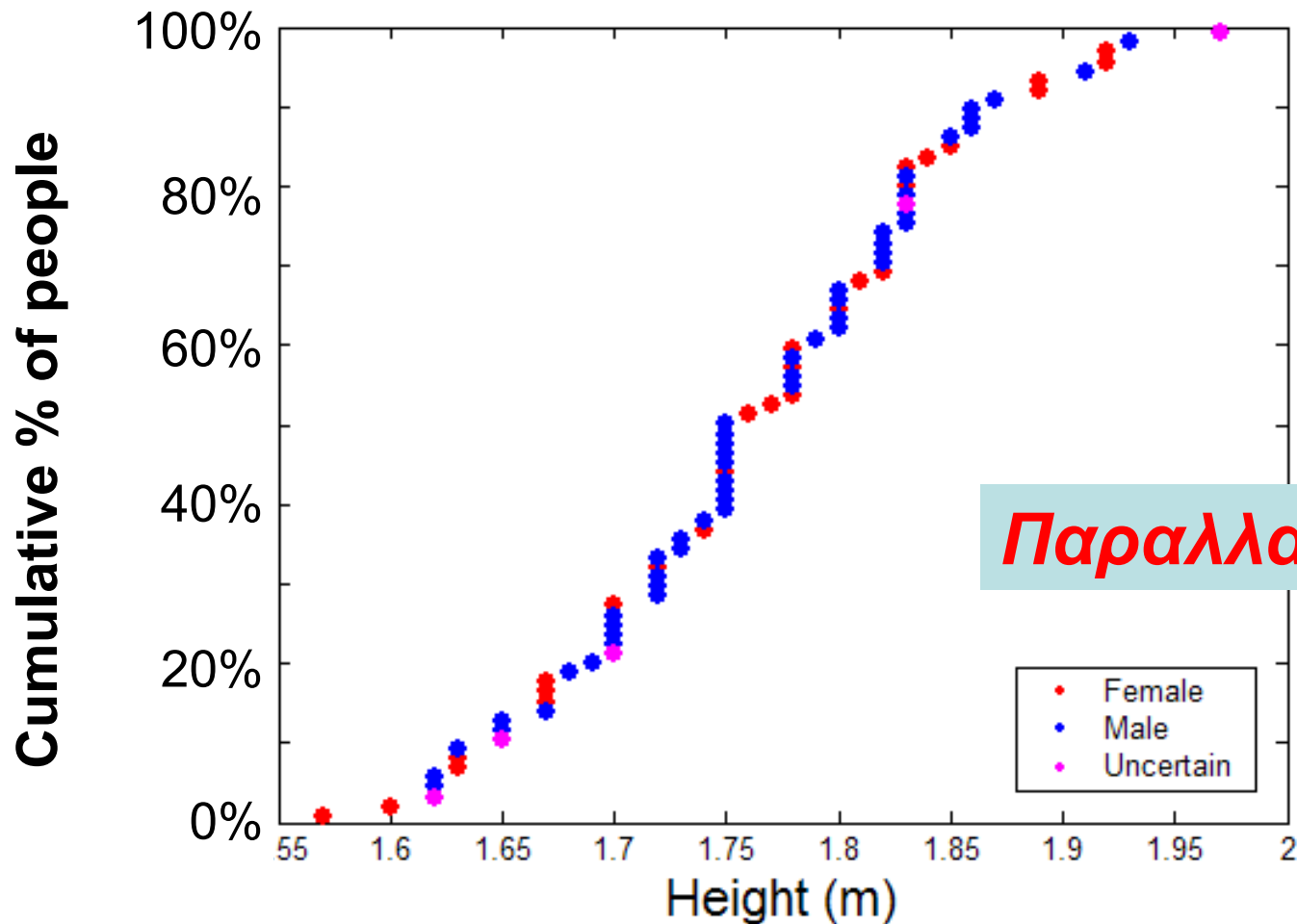
1.60	1.83	1.65	1.72
1.80	1.70	1.67	1.78
1.83	1.69	1.83	1.78
1.78	1.73	1.80	1.63
1.75	1.63	1.87	1.80
1.86	1.68	1.97	1.75
1.70	1.82	Etc.	(m)



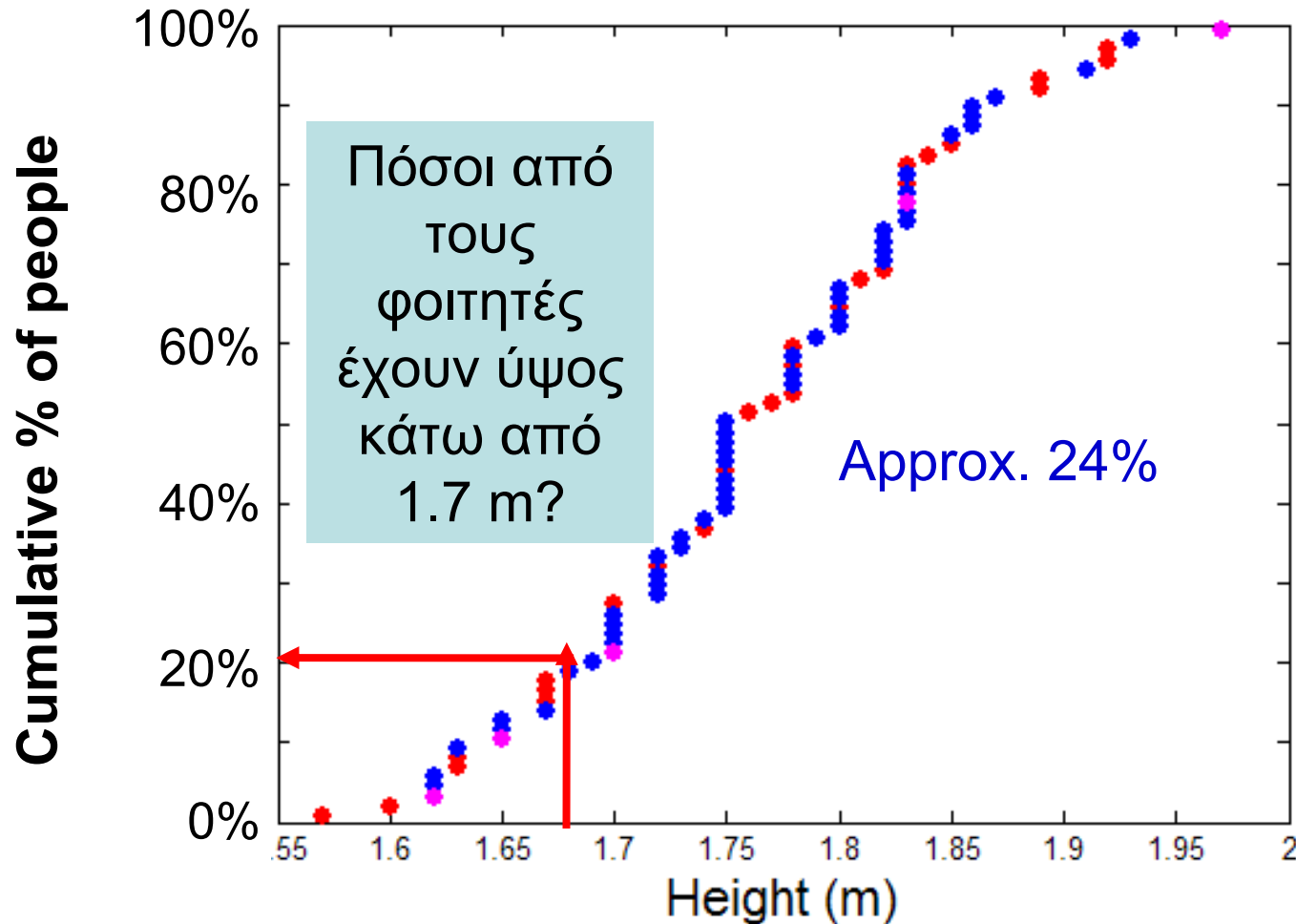
Τα ύψη των φοιτητών ακολουθούν κανονική κατανομή



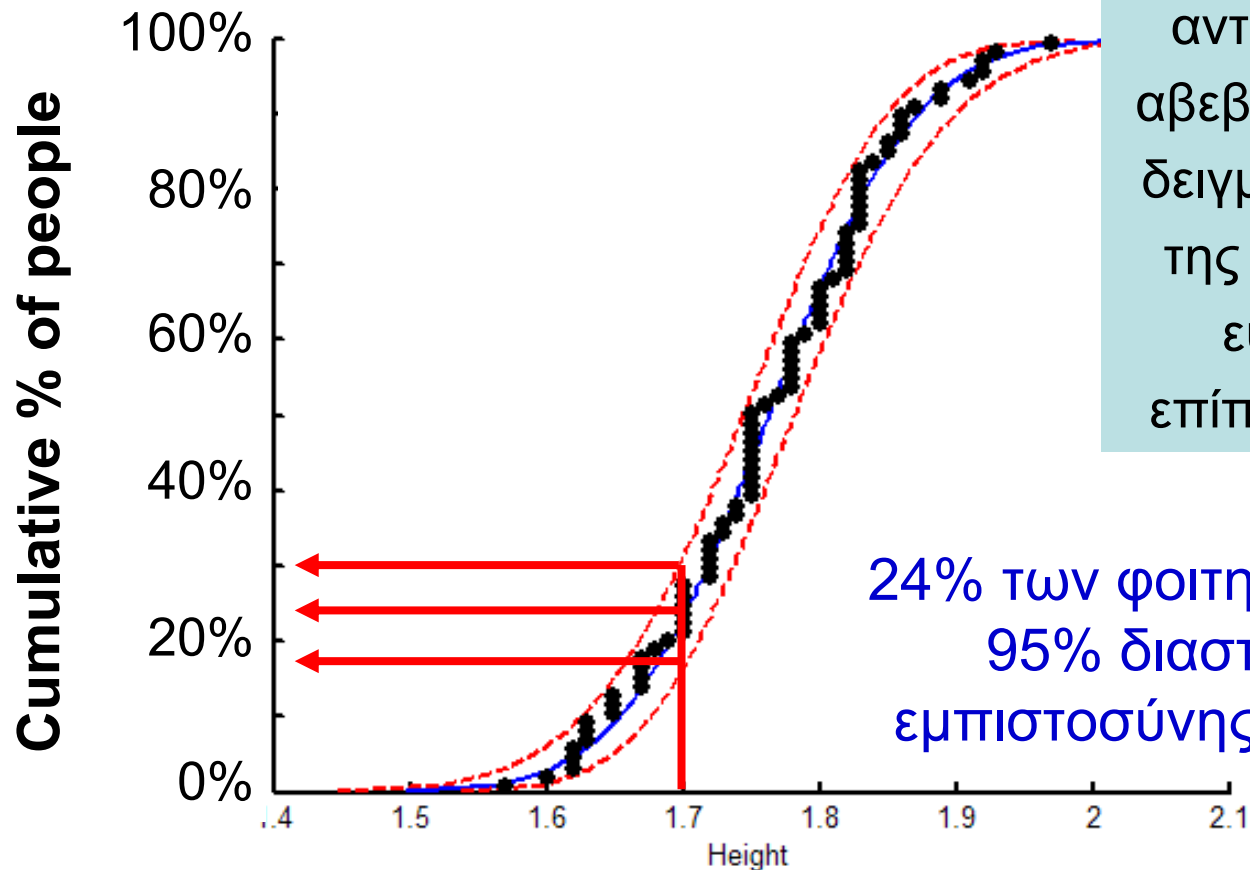
Τα ίδια δεδομένα μπορούν να σχεδιαστούν ως συσσωρευτική κατανομή (**cummulative distribution**) εάν τοποθετήσουμε τα ύψη με φθίνουσα σειρά



- Οι συσσωρευτικές κατανομές χρησιμοποιούνται συχνά στην περιβαλλοντική τοξικολογία γιατί δίνουν εύκολα απαντήσεις σε ερωτήματα

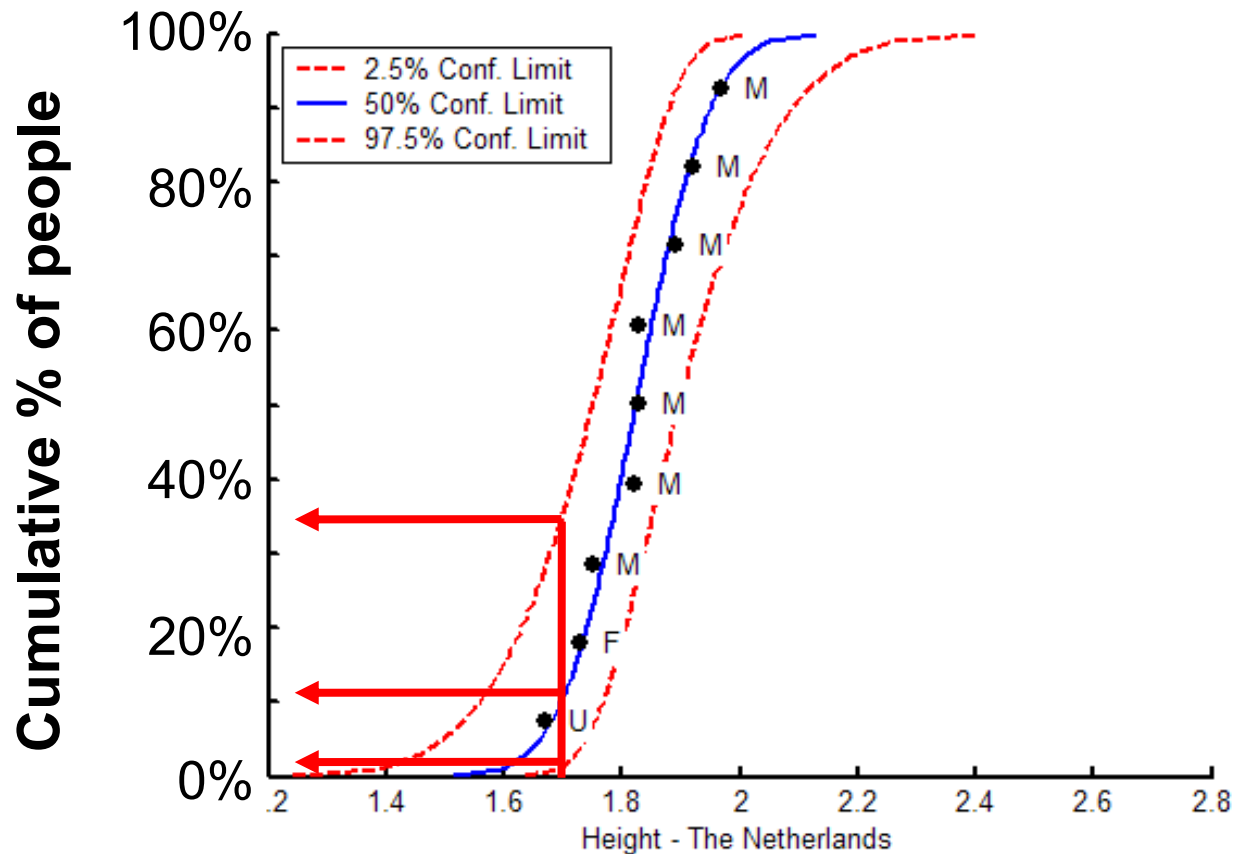


Δυνατός ο προσδιορισμός μιας προσαρμοσμένης κατανομής των τιμών και διαστημάτων εμπιστοσύνης για κάθε τιμή

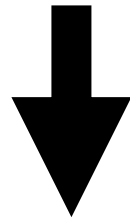


Τα διαστήματα εμπιστοσύνης αντιπροσωπεύουν αβεβαιότητα κατά την δειγματοληψία, λόγω της γενίκευσης των ευρημάτων σε επίπεδο πληθυσμού

Μικρό δείγμα παρατηρήσεων σημαίνει αυξημένη αβεβαιότητα και ευρύτερα διαστήματα εμπιστοσύνης



EC50 η NOEC τιμές για μια βιοκτόνο ουσία υπολογίζονται πειραματικά αρχικά με τους οργανισμούς δείκτες (*Daphnia magna*, *Selenastrum capricornutum*, *Lemna minor* etc.)



Συνήθης πρακτική είναι να πραγματοποιούνται και απλές μετρήσεις τοξικότητας (SSTs) και για άλλους οργανισμούς οι οποίοι θεωρούνται για γεωγραφικούς ή οικολογικούς λόγους περισσότερο σημαντικοί από τους οργανισμούς-δείκτες



Περίπτωση Εντομοκτόνου Chlorpyrifos

➤ Βασικά δεδομένα για οργανισμούς δείκτες

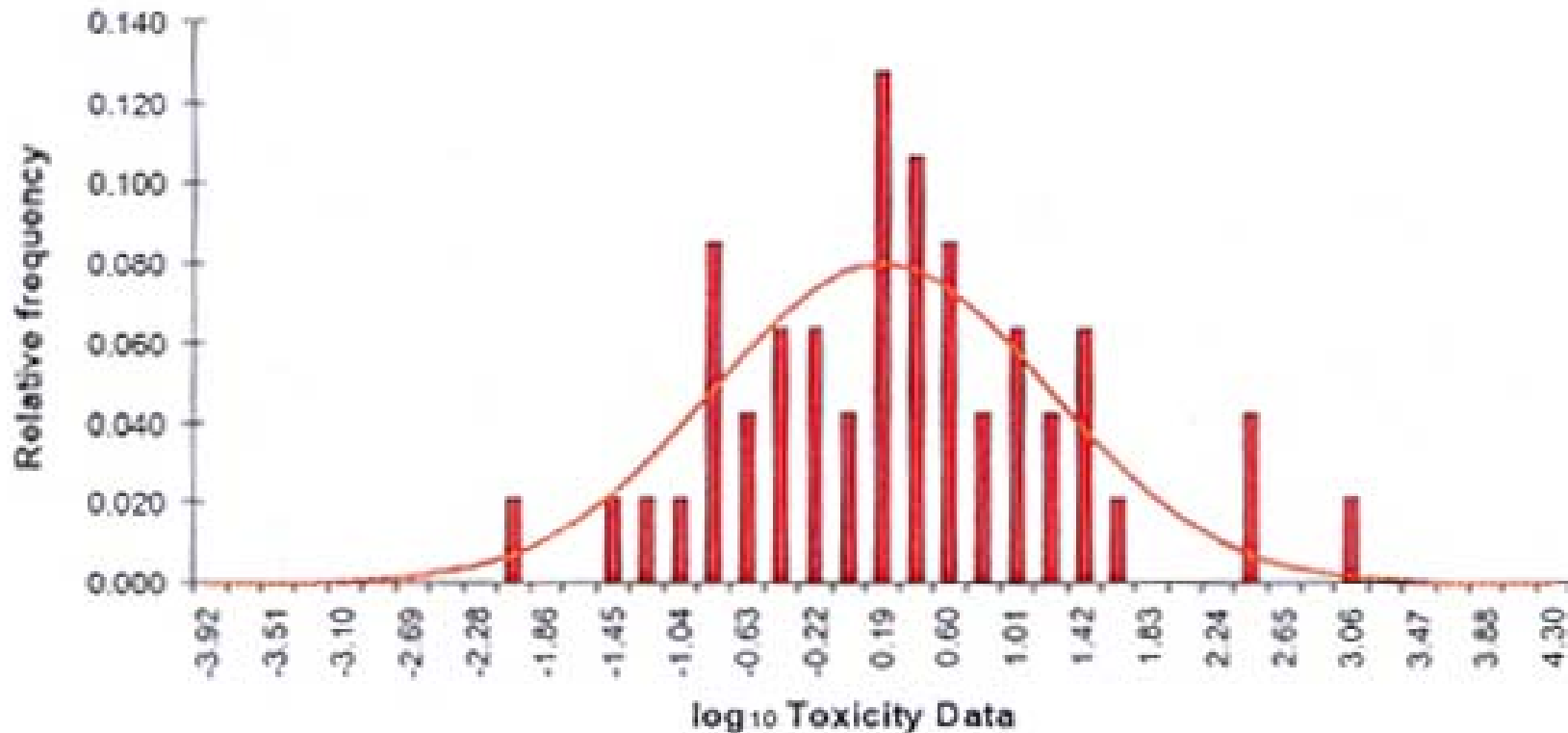
- Φύκη ($EC_{50} > 10000 \mu\text{g/L}$, $NOEC > 10,000 \mu\text{g/L}$)
- Ασπόνδυλα ($EC_{50} = 1.3 \mu\text{g/L}$, $NOEC 0.032 \mu\text{g/L}$)
- Ψάρια ($LC50 = 1.3 \mu\text{g/L}$, $NOEC 0.09 \mu\text{g/L}$)

➤ Επιπλέον δεδομένα από SSTests

- 22 ασπόνδυλα είδη
- 25 είδη ψαριών



Οι τιμές τοξικότητας μιας ουσίας σε διαφορετικά είδη μπορεί να ακολουθούν κανονική κατανομή



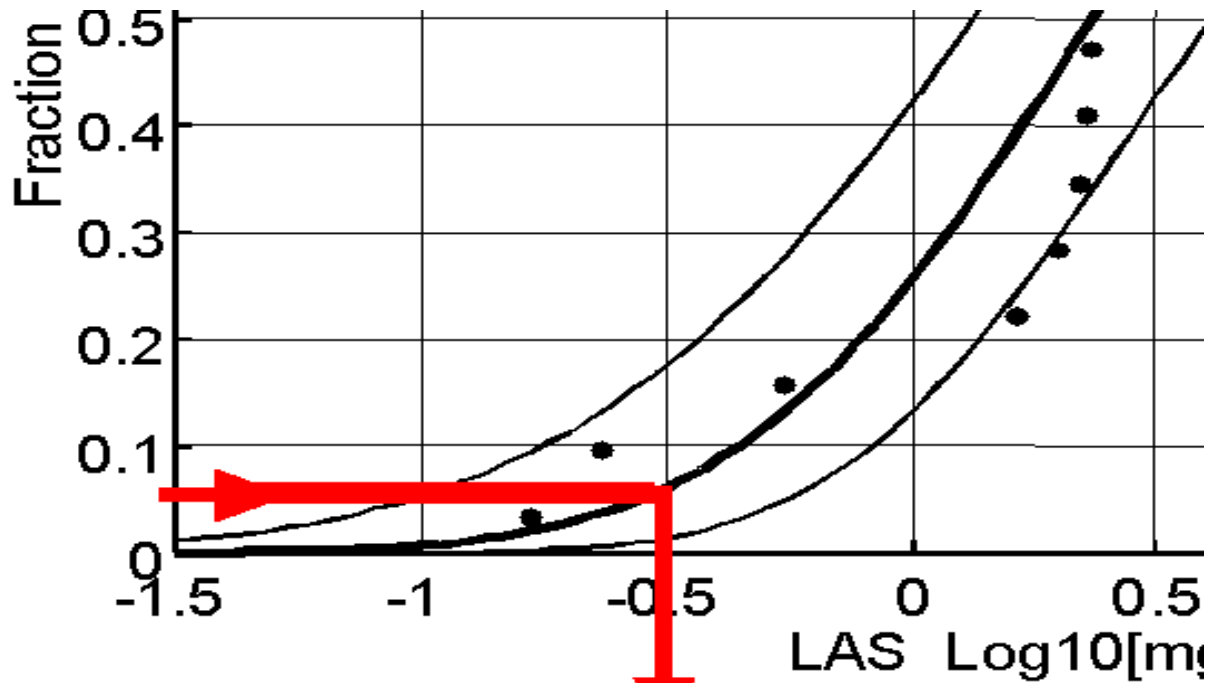
Species Sensitivity Distribution Curves

Χρησιμοποιούμε τις τιμές τοξικότητας μιας ουσίας (EC50, LC50, NOEC) όπως έχουν μετρηθεί σε Single Species Tests με διάφορα είδη-δείκτες

Προσδιορισμός των ανώτερων περιβαλλοντικών επιπέδων μιας ουσίας που δεν πρόκειται να προκαλέσει καμία επίδραση στο 95% του πληθυσμού μιας τάξης μικροοργανισμών ή της κοινότητας ενός οικοσυστήματος



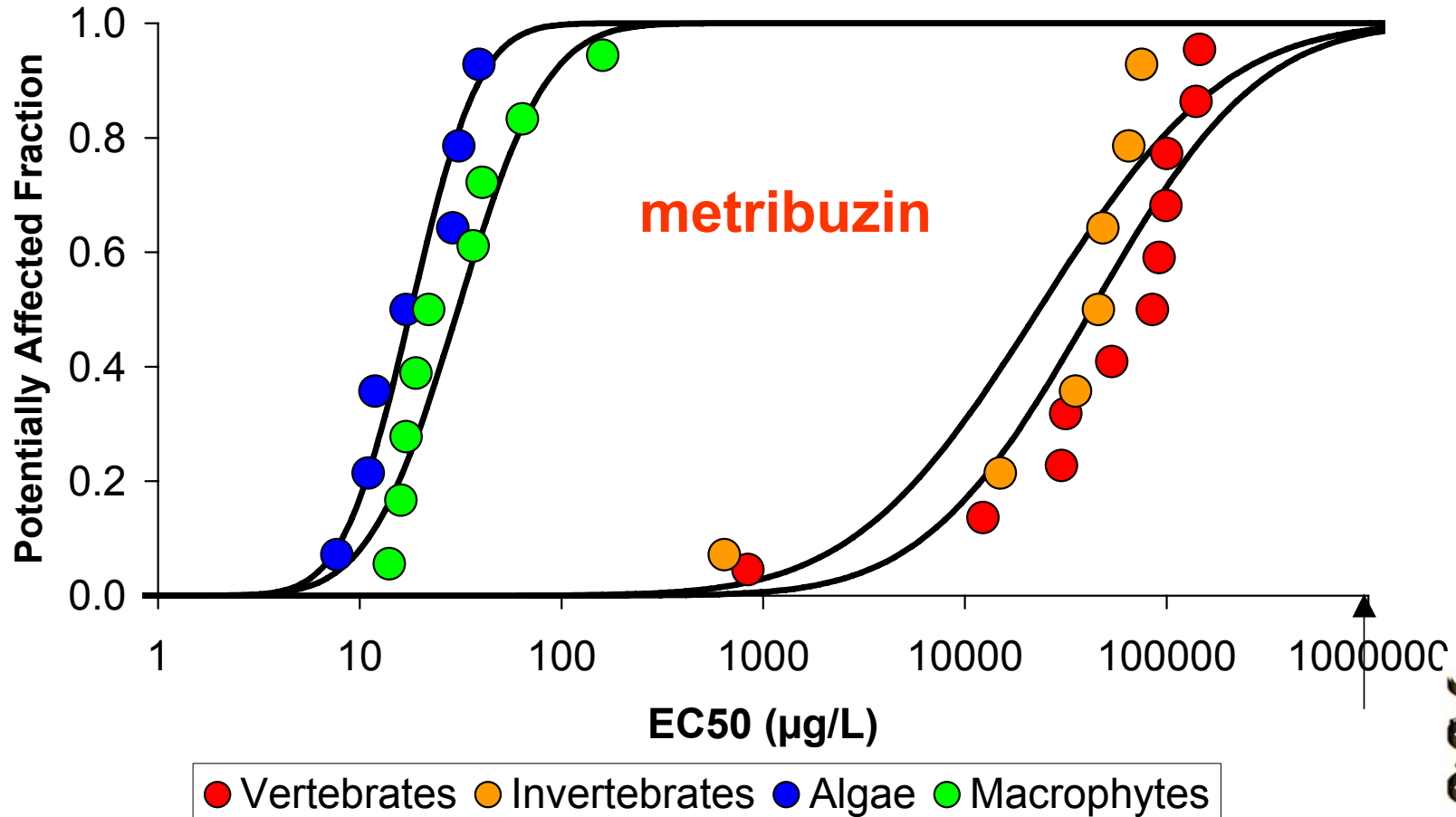
Species Sensitivity Distribution (SSDs)



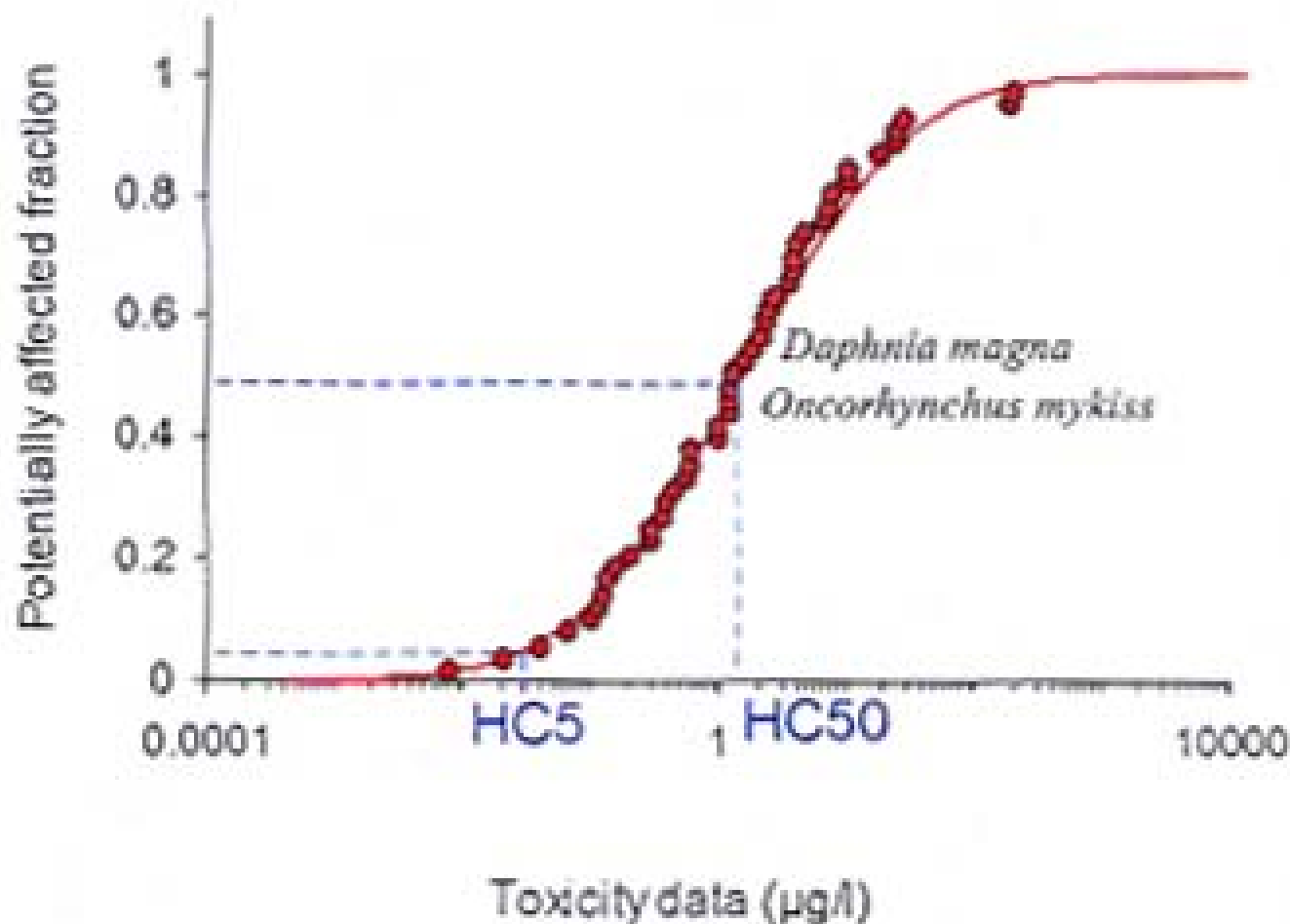
Standard setting : HC5

HC5 (Hazard concentration 5%): είναι η συγκέντρωση ενός ξενοβιοτικού που εάν παρατηρηθεί σε ένα περιβάλλον θα προκαλέσει αρνητική επίδραση στο 5% του πληθυσμού μια συγκεκριμένης τάξης οργανισμών (πχ. Ασπόνδυλα)

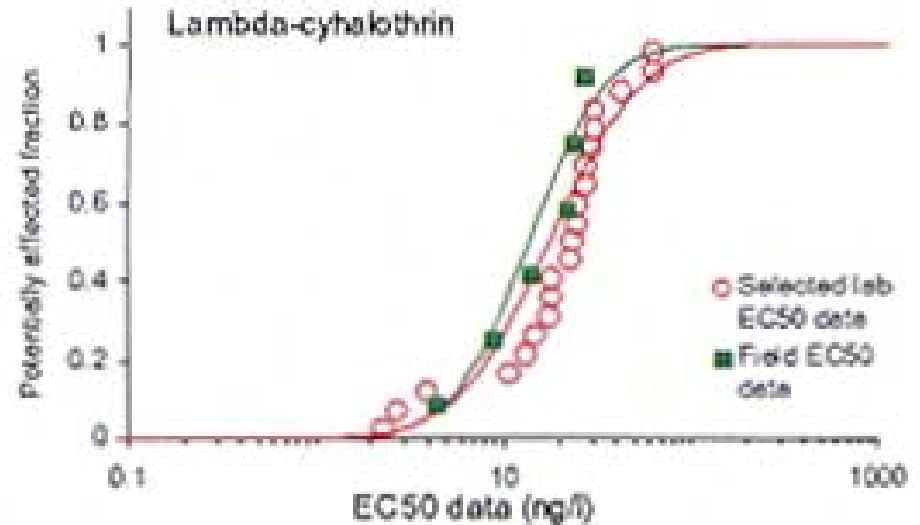
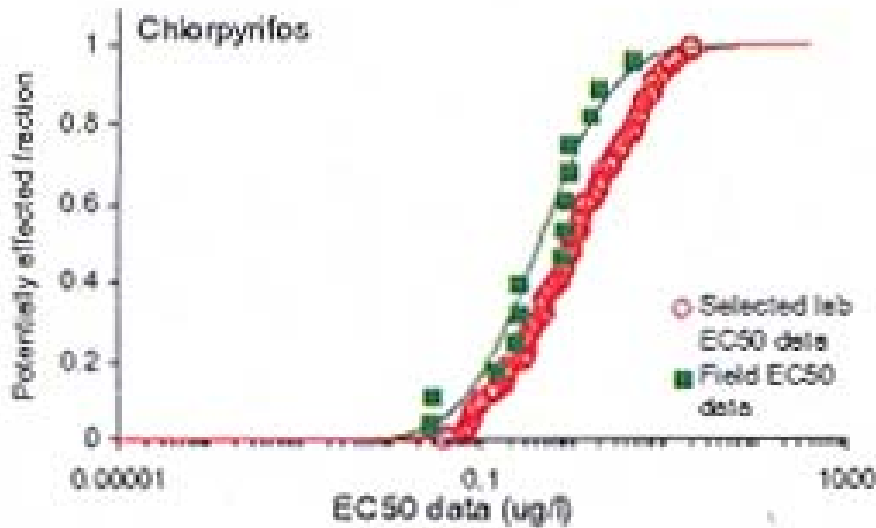
SSDs μπορούν να κατασκευαστούν με τιμές LC50 ή NOEC από διαφορετικά είδη οργανισμών που ανήκουν στην ίδια τάξη (Αρθρόποδα, Ασπόνδυλα, Σπονδυλωτά, Φύκη)



SSDs μπορούν να κατασκευαστούν και χρησιμοποιώντας τοξικολογικά δεδομένα για είδη που ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις οργανισμών



SSDs curves for Metribuzin



Γενικά υπάρχει συμφωνία μεταξύ τοξικολογικών παραμέτρων που υπολογίζονται με SSDs από δεδομένα εργαστηρίου με SSTs και από δεδομένα που προέρχονται από μικρόκοσμους ή μεσόκοσμους

Πλεονεκτήματα SSDs

- Χρησιμοποιούν όλα τα διαθέσιμα δεδομένα που υπάρχουν για διάφορους, εκτός των οργανισμών-δεικτών
- Περιορίζεται η αβεβαιότητα που υπάρχει σε χαμηλότερα επίπεδα ανάλυσης τοξικότητας όπου οι αποφάσεις μας στηρίζονται σε ένα μόνο είδος από κάθε τάξη οργανισμών
- Ενθαρρύνεται η παραγωγή πειραματικών δεδομένων και περισσότερα δεδομένα προσδίδουν μεγαλύτερη σιγουριά στις παρατηρήσεις μας και οδηγούν σε μια λιγότερο συντηρητική απόφαση για την τοξικότητα μιας ουσίας

Μειονεκτήματα SDDs

- Απαιτείται η παραγωγή μεγάλου αριθμού δεδομένων
- Ποιο είναι το καλύτερο ποσοστό HC_x που μπορούμε να πούμε ότι δεν δημιουργεί προβλήματα τοξικότητας σε επίπεδο κοινότητας (community level)?
- Η παραδοχή ότι τα είδη των οργανισμών που επιλέχθηκαν για την δημιουργία των SDDs δεν είναι η κατάλληλη
- Η παραδοχή ότι η κατανομή της αντίδρασης των οργανισμών που εξετάστηκαν μεμονωμένα αντιπροσωπεύουν την επίδραση σε επίπεδο οικοσυστήματος



Εφαρμογές SSDs

Στην Ολλανδία εάν ο έλεγχος τοξικότητας μιας ουσίας με την χρήση SSDs δείξει ότι το **κατώτερο όριο HC5 είναι χαμηλότερο από τις περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις της ουσίας** τότε θεωρείται ότι η εφαρμογή της ουσίας δημιουργεί κίνδυνο τοξικότητας σε επίπεδο κοινότητας οργανισμών

Εάν οι περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις μιας ουσίας $> HC50$ τότε απαιτείται να εφαρμοστεί απορρύπανση για αποκατάσταση του περιβάλλοντος

