

Περιβαλλοντική και Διατροφική Τοξικολογία

Μέθοδοι εκτίμησης τοξικότητας σε συστήματα πεδίου
Διαδικασίες αξιολόγησης τοξικότητας γεωργικών
φαρμάκων ΚΟ 91/414

Δημήτρης Καρπούζας



Ποιες Λύσεις Υπάρχουν για περισσότερο ρεαλισμό στην αξιολόγηση της τοξικότητας μια ουσίας?

Σύνθετα συστήματα αξιολόγησης της τοξικότητας μιας ουσίας σε επίπεδο εργαστηρίου ή πεδίου

- Μικρόκοσμοι Εργαστηρίου ή Πεδίου
- Μεσόκοσμοι Πεδίου



Χαρακτηριστικά Μικροκόσμων

Οι μικρόκοσμοι παρουσιάζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά

1. Προσπαθούν να μιμηθούν πραγματικά οικοσυστήματα
2. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το είδος των φυσικών υδρόβιων συστημάτων τα οποία προσπαθούν να αναπαραστήσουν
3. Μπορεί να είναι εσωτερικές (indoors microcosms) ή εξωτερικές (outdoors microcosms)



Εσωτερικοί Μικρόκοσμοι (Indoors Microcosms)

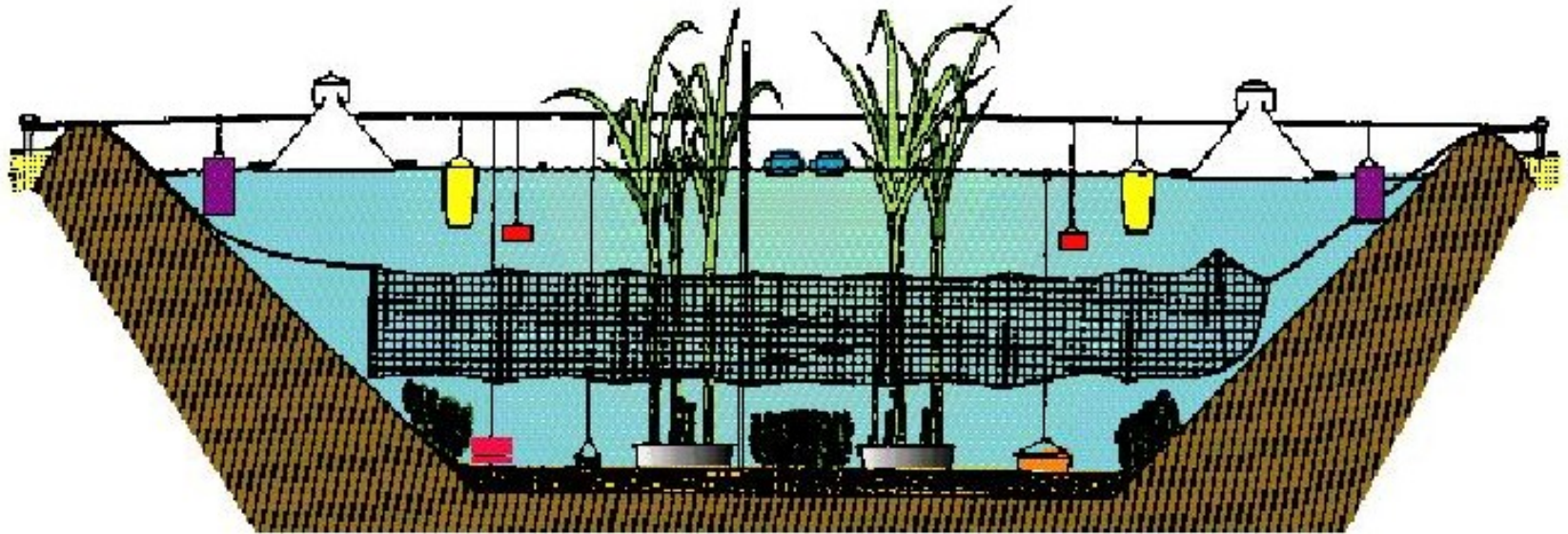


Εξωτερικοί Μικρόκοσμοι (Outdoors microcosms)



Ποιες Λύσεις υπάρχουν για περισσότερο ρεαλισμό στην αξιολόγηση της τοξικότητας μια ουσίας?

Μεσόκοσμοι



Μεσόκοσμοι - Ορισμός

Σύμφωνα με το Odum (1984) *Οι μεσόκοσμοι αποτελούν εξωτερικές διαμορφωμένες πειραματικές κατασκευές που αντιπροσωπεύουν συστήματα μεταξύ των εργαστηριακών μικρόκοσμων και των σύνθετων, φυσικών οικοσυστημάτων*

Ο πιο πρόσφατος ορισμός των μεσοκόσμων τους περιγράφει ως φυσικά διαχωρισμένα πολυτροφικά και αυτόσυντηρούμενα συστήματα που έχουν χρόνο διάρκειας που ξεπερνά τον χρόνο του βιολογικού κύκλου του είδους που βρίσκεται στο ανώτερο τροφικό επίπεδο και έχουν μέγεθος αρκετό ώστε η λήψη δειγμάτων και η πραγματοποίηση μετρήσεων να γίνεται χωρίς σοβαρή επίδραση στην σύσταση και δυναμική του συστήματος

Εγκαταστάσεις Μεσοκόσμων (Mesocosms)



Μεσόκοσμοι (Mesocosms) – Μέγεθος

- Μικρότερα σε μέγεθος και σε πολυπλοκότητα από φυσικά οικοσυστήματα
- Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 10-20 m μήκος.
- Μεγαλύτεροι μεσόκοσμοι παρουσιάζουν προβλήματα υψηλής παραλλακτικότητας ενώ
- Μικρότεροι μεσόκοσμοι δεν παρέχουν αρκετό χώρο για ανάπτυξη σχέσεων μεταξύ οργανισμών των διαφόρων τροφικών επιπέδων ενώ η συχνή λήψη δειγμάτων θα επηρεάζει την ισορροπία του οικοσυστήματος



Τι χρειάζεται για να κατασκευάσουμε ένα μεσόκοσμο?

- **Νερό:** Συνήθως προέρχεται από φυσικά «μη ρυπασμένα» υδρόβια συστήματα (Ανάλυση Νερού?)
- **Ίζημα:** Συνήθως προέρχεται από φυσικά «μη ρυπασμένα» υδρόβια συστήματα αλλά χρησιμοποιούνται εναλλακτικά τεχνητά υποστρώματα ή μίγματα φυσικού ιζήματος και τεχνητών υποστρωμάτων
- **Οργανισμούς:** Είδη από διάφορα τροφικά επίπεδα που θα έχουν δομικό αλλά και λειτουργικό ρόλο στην δημιουργία και σταθεροποίηση του τεχνητού οικοσυστήματος

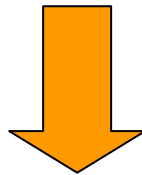


Τι είδους μικροοργανισμούς θα χρησιμοποιήσουμε στους μεσόκοσμους?

- Οργανισμούς που εξασφαλίζουν δομική σταθερότητα όπως μακρόφυτα
- Οργανισμούς που αποτελούν πρωτογενείς παραγωγούς (φύκη)
- Οργανισμούς που συμμετέχουν στην αποδόμηση και ανακύκλωση της οργανικής ύλης (μικροοργανισμούς και ασπόνδυλα)

Η προσθήκη ψαριών δεν ενδείκνυται (Γιατί?) εκτός εάν βασικός στόχος είναι η μελέτη της επίδρασης της ουσίας σε αυτά

Αμέσως μετά την εισαγωγή των οργανισμών στους μεσόκοσμους απαιτείται ένα χρονικό διάστημα σταθεροποίησης και ωρίμανσης του οικοσυστήματος (stabilization period) που ανάλογα με το μέγεθος των μεσόκοσμων, την πολυπλοκότητα και την προέλευση των υλικών (ίζημα, νερό, οργανισμών) κυμαίνεται από 2 – 12 μήνες



Ανακύκλωση του νερού μεταξύ παρακείμενων μεσόκοσμων κατά την διάρκεια της ωρίμανσης περιορίζει την παραλλακτικότητα μεταξύ παρακείμενων μεσοκόσμων

Πως επιλέγεται η χρονική διάρκεια πειραματισμού των μεσόκοσμων?

- Στόχος του πειράματος
- Είδος της εξεταζόμενης ουσίας (Διασπάται αργά ή γρήγορα?)

Χρονικό διάστημα ικανό για παρατήρηση των άμεσων αλλά και έμμεσων επιδράσεων της χημικής ουσίας στους οργανισμούς του μεσόκοσμου

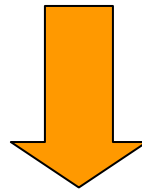


Καθορισμός Κριτηρίων Τοξικότητας στους Μεσόκοσμους

- Μέτρηση Παραμέτρων – δεικτών της λειτουργικότητας του οικοσυστήματος των μεσόκοσμων (**Functional Points**) – **Διαλυτό Οξυγόνο, Διάσπαση Οργανικής Ύλης, Αλκαλικότητα κ.α.**
- Μέτρηση Παραμέτρων – δεικτών της σύστασης και δομής της βιοκοινότητας των μεσόκοσμων (**Structural Points**) – **Μεταβολές στον πληθυσμό οργανισμών όπως φύκη, μακρόφυτα, ασπόνδυλα κ.α.**



Τα πιο σύνθετα συστήματα αξιολόγησης της τοξικότητας μιας ουσίας παρέχουν μια ρεαλιστική, όσο το δυνατό, εικόνα της τοξικότητας της ουσίας στο περιβάλλον αλλά συνήθως σύνθετα συστήματα δίνουν και σύνθετες παρατηρήσεις που απαιτούν σύνθετη ανάλυση ώστε να βγουν συμπεράσματα



Principal Response Curves



Ανάλυση Αποτελεσμάτων από Μεσόκοσμους?

Πολύπλοκές στατιστικές τεχνικές με πιο διαδεδομένη την απεικόνιση με την μορφή **Principal Response Curves** (Καμπύλες Κύριας Αντίδρασης, PRCs)

Στηρίζεται στην πρόβλεψη της αφθονίας κάθε συγκεκριμένου είδους οργανισμού με την χρήση συγκεκριμένων στατιστικών μοντέλων

Η επίδραση της κάθε μεταχείρισης είναι η μέση διαφορά του πληθυσμού στους μεσόκοσμους της *μεταχείρισης A* σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή στους μεσόκοσμους του *μάρτυρα* ανά εβδομάδα

$$y_{d(j)tk} = \bar{y}_{0tk} + b_k c_{dt} + e_{d(j)tk}$$

$y_{d(j)tk}$ = ο πληθυσμός του είδους k στο μεσόκοσμο j της μεταχείρισης d στο χρόνο t

\bar{y}_{0tk} = ο πληθυσμός του είδους k στο χρόνο t στο μεσόκοσμο μάρτυρα ($d=0$)

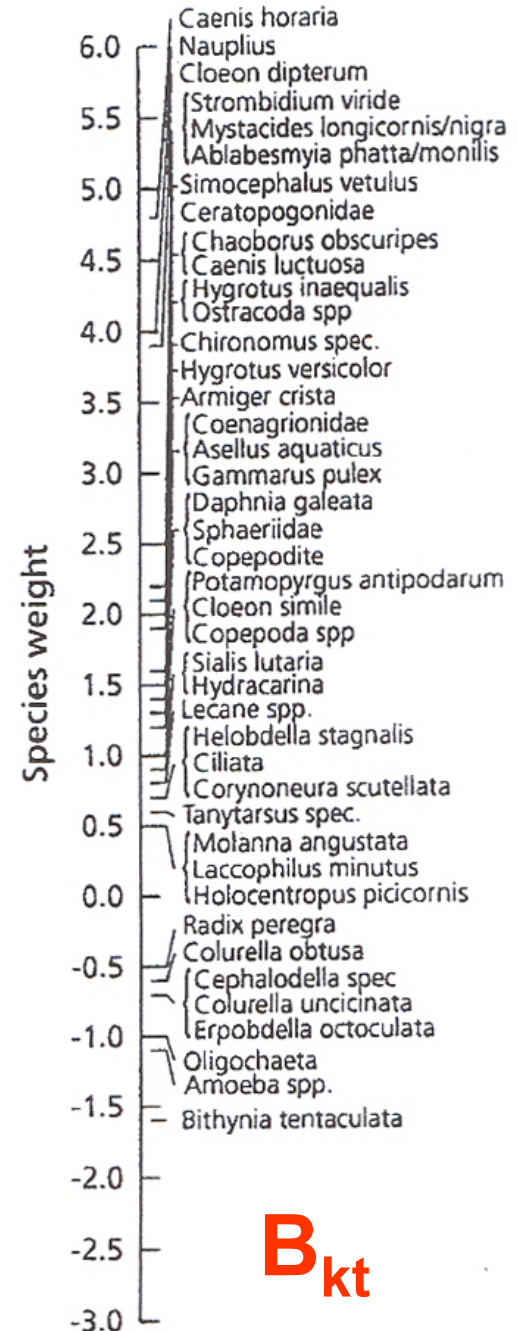
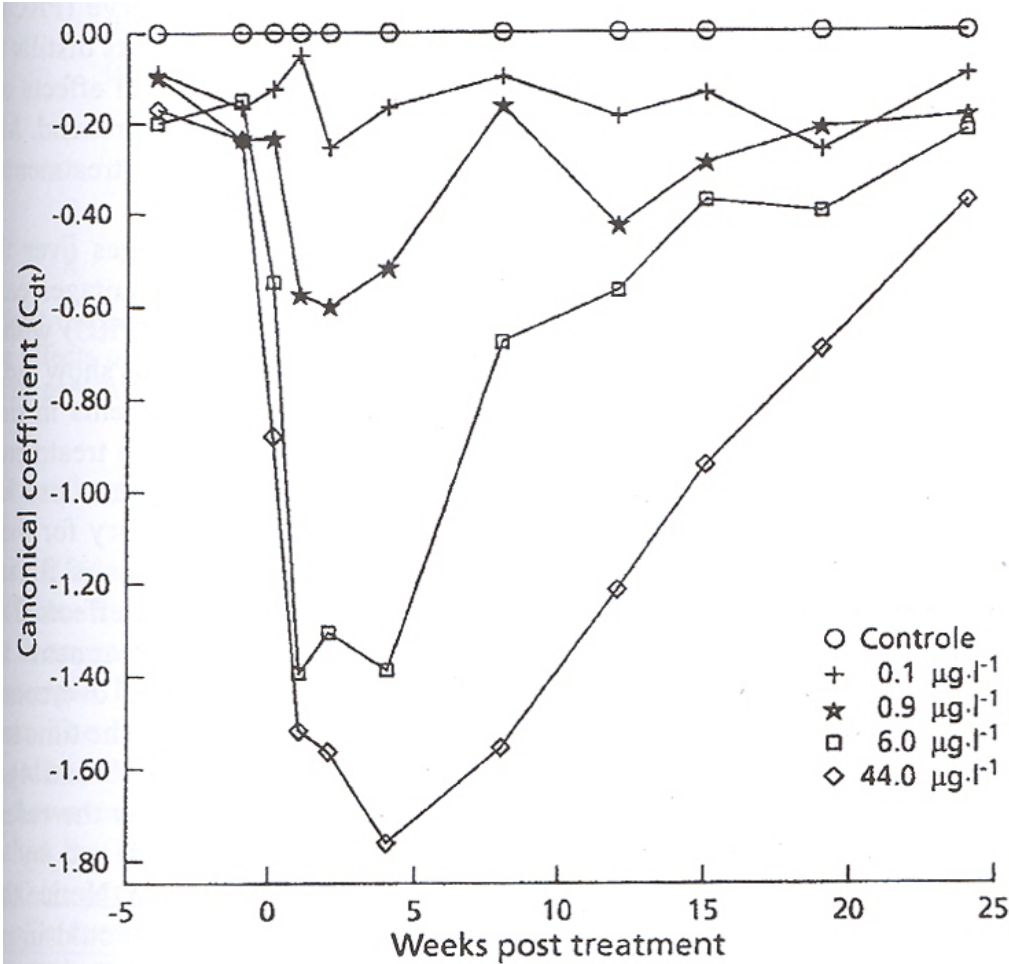
$e_{d(j)tk}$ = στατιστικό λάθος

b_k = species weight

c_{dt} = συντελεστής κανονικότητας

$b_k \times c_{dt} = T_{dtk}$ (% effect of the treatment relative to the control)

Παράδειγμα Principle Response Curve I - Ασπόνδυλα

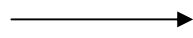


B_{kt}

$$b_k \times c_{dt} = T_{dtk} \text{ (% effect of the treatment relative to the control)}$$

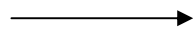
Επεξήγηση PRCs αποτελέσματα

**Τιμές b_{kt} υψηλές
και θετικές**



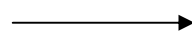
Οι μεταβολές στον πληθυσμό του είδους λόγω της μεταχείρισης ακολουθούν την τάση που περιγράφεται από την PRC

**Τιμές b_{kt} υψηλές
και αρνητικές**

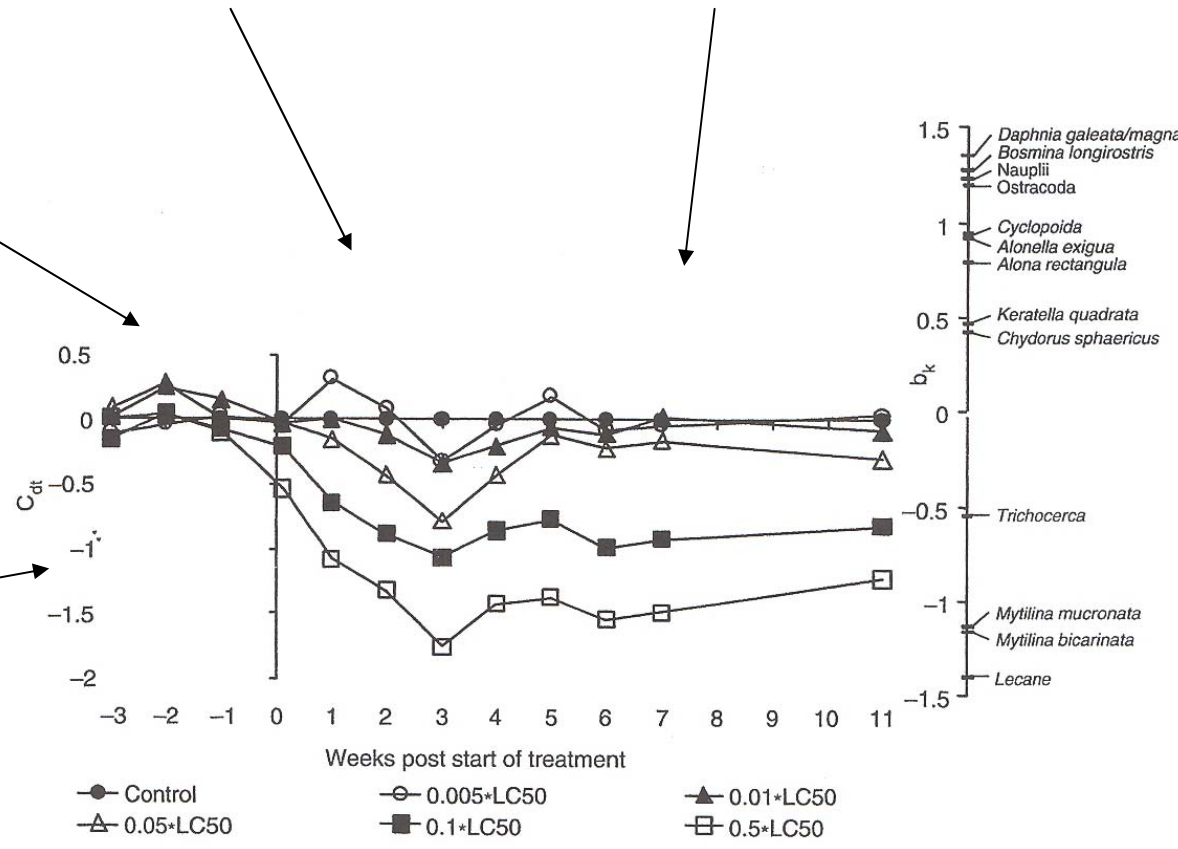
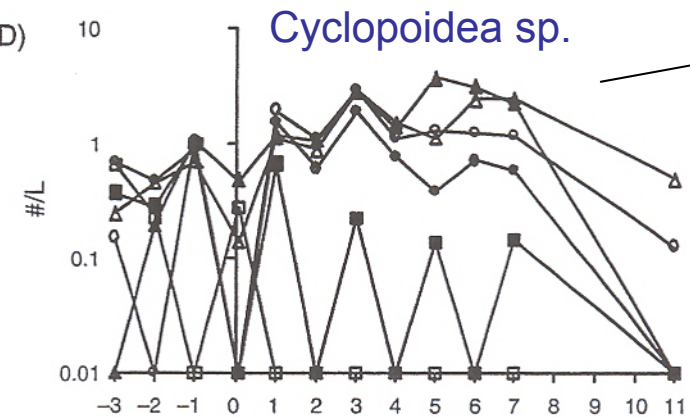
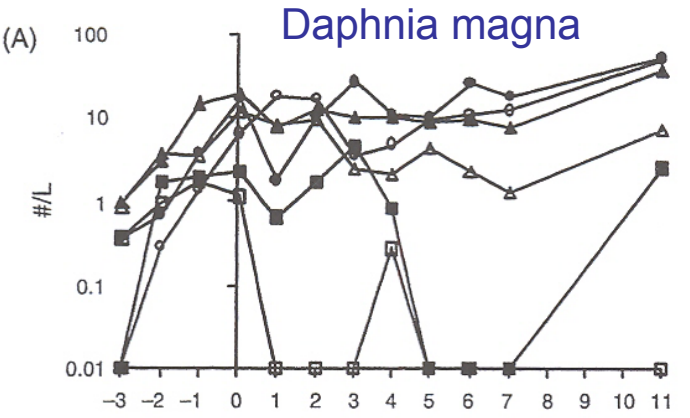
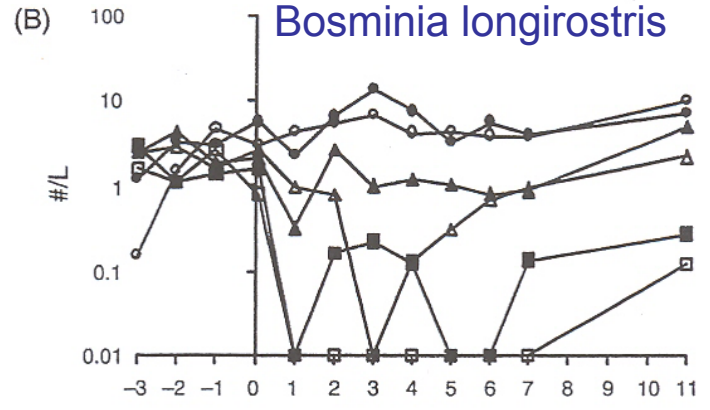
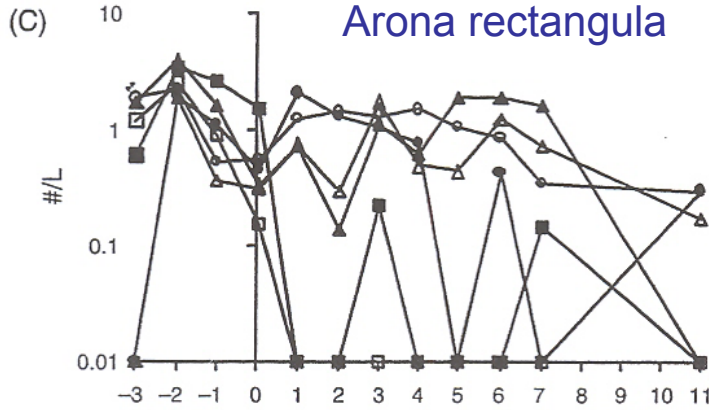


Οι μεταβολές του πληθυσμού του είδους λόγω της μεταχείρισης ακολουθούν την ακριβώς αντίθετη τάση από αυτή που περιγράφεται από την PRC

$-0.5 < \text{Τιμές } b_{kt} < 0.5$



Ο πληθυσμός του είδους δεν παρουσιάζει καμία αντίδραση ως αποτέλεσμα της μεταχείρισης ή η αντίδραση που παρουσιάζει δεν συσχετίζεται με την τάση της PRC



Ασπόνδυλα - ζωοπλαγκτόν

Πλεονεκτήματα Μεσοκόσμων

- Πιο ρεαλιστική προσέγγιση του περιβάλλοντος και των συνθηκών έκθεσης αν και εμπεριέχουν ακόμη κάποιες συντηρητικές παραδοχές (κλειστά συστήματα)
- Αποτελούν τεστ πολλαπλών ειδών και συνεπώς επιτρέπουν την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ ειδών που διαβιούν στο ίδιο ενδιαίτημα
- Δυνατή η παρακολούθηση του ρυθμού ανάκαμψης του πληθυσμού διαφόρων ειδών και η επαναποίκηση
- Άμεση παρακολούθηση των επιδράσεων από την έκθεση στις ξενοβιοτικές ουσίες που συνεπάγεται περιορισμένη αβεβαιότητα (**uncertainty**)



Μειονεκτήματα Μεσοκόσμων

- Αυξημένη παραλλακτικότητα μεταξύ επαναλήψεων
- Δύσκολη η ανάλυση των δεδομένων από τέτοια πολύπλοκα και πολυπαραγοντικά τεστ
- Είναι δυνατός ο υπολογισμός NOEC για κάθε είδος ξεχωριστά αλλά έτσι χάνεται το πλεονέκτημα της μελέτης σε επίπεδο κοινότητας
- Υψηλό κόστος
- Σχετικά πρόσφατες πειραματικές προσεγγίσεις που δεν έχουν ακόμη ξεκάθαρα πρωτόκολλα για την πραγματοποίησή τους (πχ. Πιο κριτήριο χρησιμοποιούμε για να πούμε ότι είδαμε επίδραση.....θάνατο, αναπαραγωγή, αναστολή ανάπτυξης?)

Τεχνητά Οικοσυστήματα vs Φυσικά Οικοσυστήματα

Πλεονεκτήματα Τεχνητών Οικοσυστημάτων

- Δυνατός ο πειραματικός έλεγχος και οι στατιστικές επαναλήψεις στα Τεχνητά Οικοσυστήματα
- Τα Τεχνητά Οικοσυστήματα είναι εύχρηστα συστήματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για πλήθος άλλων πειραμάτων
- Τα Τεχνητά Οικοσυστήματα παρέχουν ευκολία στην λήψη δειγμάτων
- Τα Τεχνητά Οικοσυστήματα παρουσιάζουν χαμηλό κόστος
- Ερωτήματα βιοηθικής για τον ανεξέλεγκτο πειραματισμό σε φυσικά οικοσυστήματα



Τεχνητά Οικοσυστήματα vs Φυσικά Οικοσυστήματα

Μειονεκτήματα Τεχνητών Οικοσυστημάτων

- Δεν υπάρχουν απόλυτα ανάλογα των φυσικών οικοσυστημάτων
- Απουσία μεγάλων θηρευτών που βρίσκονται ψηλά στην τροφική αλυσίδα

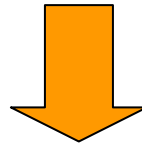


Φυσικά Οικοσυστήματα και μετρήσεις Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας



Πως μπορούμε να αξιολογήσουμε την ποιότητα των επιφανειακών νερών σε ένα φυσικό οικοσύστημα?

Χημική ποιότητα: Παρακολούθηση με τακτικές χημικές αναλύσεις των συγκεντρώσεων οργανικών, ανόργανων ρύπων στα νερά



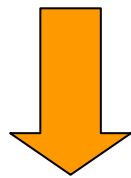
Η χρήση πολυδύναμων μεθόδων ανάλυσης με την χρήση ιδιαίτερα ευαίσθητου αναλυτικού εξοπλισμού (GC-MS, LC-MS) επιτρέπουν την ανίχνευση και ταυτοποίηση οργανικών ρύπων (γεωργικών φαρμάκων και προϊόντων μεταβολισμού τους, κ.α.) σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού σε επίπεδα 0.001 ppb με αξιοπιστία



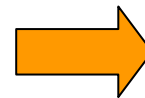
Πως μπορούμε να αξιολογήσουμε την ποιότητα των επιφανειακών νερών σε ένα φυσικό οικοσύστημα?

Οι χημικές αναλύσεις παρέχουν πληροφορίες για την ταυτότητα και τις συγκεντρώσεις των ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα

Δεν μπορούν όμως να μας δώσουν πληροφορίες για την τοξική επίδραση αυτών των συγκεντρώσεων στους οργανισμούς που διαβιούν στο υδρόβιο περιβάλλον, η ποιότητα του οποίου μελετάται



Παρουσία πολλών ρύπων στο ίδιο οικοσύστημα (μίγματα ρύπων και συνεργισμός?)

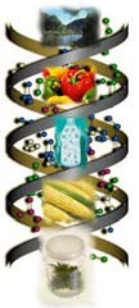


Χρειαζόμαστε τεστ τοξικότητας για να εκτιμήσουμε την οικολογική ποιότητα των νερών

Σύστημα Microtox®

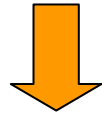
Εμπορικά κιτ που περιέχουν αποξηραμένα φθορίζοντα θαλάσσια βακτήρια του είδους *Vibrio fischeri* και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της τοξικότητας περιβαλλοντικών δειγμάτων (νερά, εδάφη, ιζήματα) αλλά και άλλων ουσιών σε καθαρή μορφή

Το 1981 η εταιρεία Beckman Instruments εισήγαγε στην αγορά το σύστημα Microtox®



Αρχή Συστήματος Microtox®

Ο μηχανισμός φθορισμού του βακτηρίου *Vibrio fischeri* είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και παραγωγής ενέργειας από το βακτήριο



Μείωση του φθορισμού σημαίνει αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας του βακτηρίου



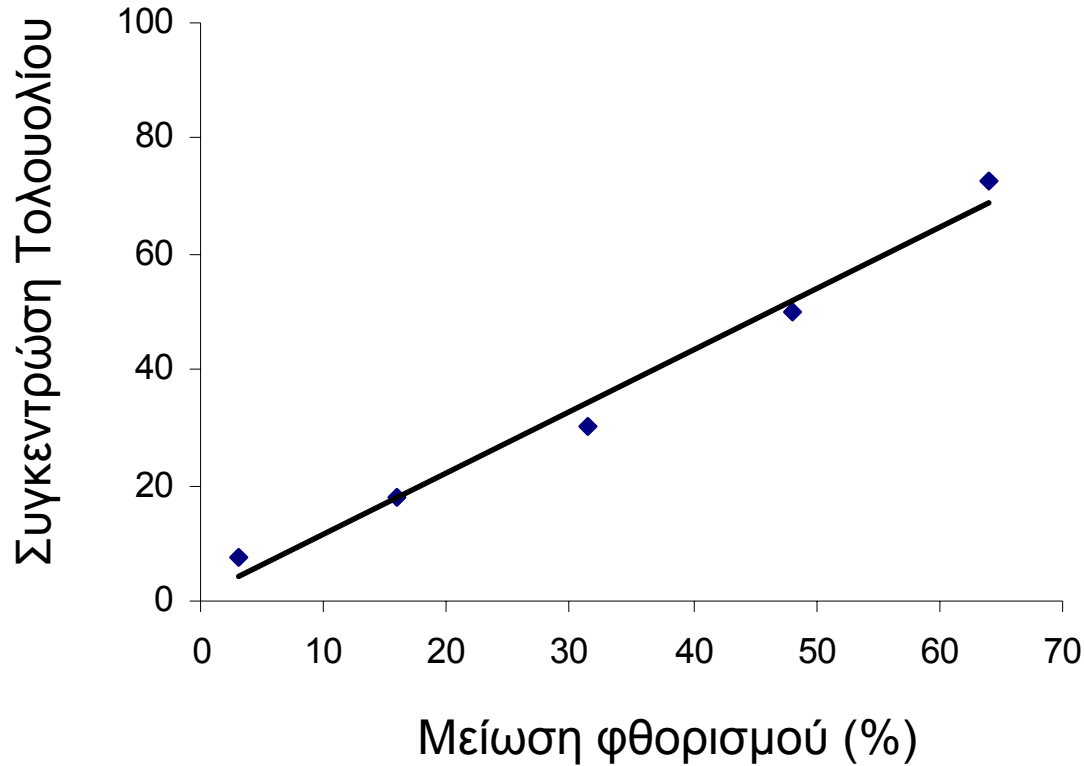
Έκθεση του βακτηρίου σε περιβαλλοντικά δείγματα που περιέχουν διάφορους ρύπους και μείωση του φθορισμού σε σχέση με τον φθορισμό βακτηρίων που εκτέθηκαν σε νερό είναι ένδειξη της τοξικότητας του δείγματος

Αξιολόγηση Συστήματος Microtox®

- Ευαίσθητο σε πλήθος ρύπων όπως γεωργικά φάρμακα, μέταλλα, αμμωνία, φαινολικά, οργανικούς διαλύτες, PAHs
- Καλή συσχέτιση των δεδομένων τοξικότητας με την χρήση Microtox® σε σχέση με άλλα παραδοσιακά τεστ τοξικότητας με οργανισμούς-δείκτες (*Daphnia magna*, *Pimephales promeles*, *Selenastrum capricornutum*)



Αξιολόγηση Συστήματος Microtox®



Το παράδειγμα των Γεωργικών Φαρμάκων – Τοξικολογική Αξιολόγηση



Προστατεύοντας το Περιβάλλον από τα Γεωργικά Φάρμακα

- Υπόγεια νερά (Πόσιμο Νερό)
- Επιφανειακά νερά (ψάρια, υδρόβια)
- Έδαφος (αρθρόποδα)
- Καλλιέργειες (πουλιά)
- Αέρας



Αξιολόγηση του κινδύνου από χρήση γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ

Όλες οι διαδικασίες αξιολόγησης καθορίζονται λεπτομερώς από τη **Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/414**

- Εταιρείες καταθέτουν ντοσιέ για ένα γεωργικό φάρμακο σε ένα κράτος μέλος που ονομάζεται Rapporteur
- Χώρες μέλη στέλνουν το ντοσιέ για αξιολόγηση στην ΕΕ
- Η ΕΕ αποφασίζει για την έγκριση ή όχι του γεωργικού φαρμάκου.
- Η χώρα-μέλος έχει και ένα τελευταίο λόγο

Αλλά όλες οι χώρες-μέλη πρέπει να κάνουν την αξιολόγηση με βάση τα καθορισμένα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την ΕΕ

Κοινοτική Οδηγία 91/414/ΕΕC

- Τα πειραματικά δεδομένα που απαιτούνται και οι διαδικασίες αξιολόγησης περιγράφονται σε παραρτήματα (Annexes)
 - ⇒ Παράρτημα I – λίστα με όλες τις δραστικές που έχουν πάρει έγκριση για χρήση σε εμπορικά σκευάσματα.
 - ⇒ Παράρτημα II – Απαιτούμενα δεδομένα για την καθαρή δραστική ουσία
 - ⇒ Παράρτημα III – Απαιτούμενα δεδομένα για ένα σκεύασμα της δ.ο
 - ⇒ Παράρτημα IV and V – φράσεις κινδύνου και ασφάλειας
 - ⇒ Παράρτημα VI - the Uniform Principles: η διαδικασία λήψης αποφάσεων από τις χώρες μέλη στις οποίες έχει κατατεθεί το γ.φ προς έγκριση
- Η ισχύς της κοινοτικής οδηγίας έληξε το Ιούλιο 2003 και ανανεώθηκε μέχρι τον Δεκέμβριο 2008

Ορισμοί

- **Exposure:**

- Τα επίπεδα μιας ουσίας στο περιβάλλον στα οποία εκτίθενται οι οργανισμοί

- **Hazard:**

- Το ενδεχόμενο μια ουσία να προκαλέσει βλάβη
- Προϋπάρχουσα ιδιότητα μιας ουσίας
e.g.: η τοξικότητα μιας ουσίας σε οργανισμούς

- **Risk:**

- Η πιθανότητα ο κίνδυνος που ενέχει μια ουσία να προκαλέσει τραυματισμό ή βλάβη
- Εξαρτάται από το χειρισμό και εφαρμογή μιας ουσίας ή από την δοσολογία με την οποία εφαρμόζεται ώστε η πιθανότητα πρόκλησης κινδύνου να ελαττωθεί



Πως γίνεται η εκτίμηση της επικινδυνότητας (Risk Assessment)?

$$\text{Risk} = \underline{\text{Έκθεση (Exposure)}} \times \underline{\text{Επίδραση (Hazard)}}$$



Pesticide Environmental

Concentration (PECs) στα
διαφορετικά περιβαλλοντικά
υποστρώματα



Πρόβλεψη με την χρήση
Μαθηματικών Μοντέλων



Toxicological Endpoints:

Τοξικολογικές μετρήσεις
τοξικότητας (LC_{50} ή EC_{50} και
NOEC/NOEL)



Πειράματα Εργαστηρίου

Εκτίμηση της περιβαλλοντικής έκθεσης

- PECs έδαφος
- PECs υπόγεια νερά
- PECs επιφανειακά νερά
- PECs αέρα
- **ETE (Estimated Theoretical Exposure):** έκθεση διαμέσου της διατροφής για πουλιά και θηλαστικά



Εκτίμηση των Τοξικολογικών επιδράσεων

Μεμονωμένα είδη που θεωρούνται αντιπροσωπευτικά για τάξης οργανισμών-μη στόχων επιλέχθηκαν ως τα περισσότερο ευαίσθητα είδη και θεωρούνται είδη δείκτες για τοξικολογικά τεστ:

- Φύκη (*Selenastrum capricornutum*, *Anabaena flos-aque*)
- Ασπόνδυλα (*Daphnia magna*, *Chironomus*)
- Ψάρια (*Onchorynchus mykiss*, *Lepomis macrochirus*)
- Υδρόβια Φυτά (*Lemna gibba*)
- Μέλισσες
- Γεωσκώληκες
- Εδαφικοί οργανισμοί μη-στόχοι
- Ωφέλιμα αρθρόποδα (*Aphidius rhopalosiphi*)
- Φυτά μη-στόχοι
- Πουλιά (*Bobwhite quail*, *Mallard duck*)



Διαδικασία Εκτίμησης της Επικινδυνότητας για τα Γεωργικά Φάρμακα στην ΕΕ

Υπολογισμός Predicted Environmental Concentrations (PECs)

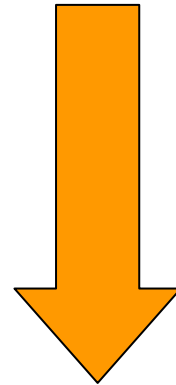


Υπολογισμός Toxicological Endpoints – LC₅₀/EC₅₀, NOEC/NOEL

TER_{οξεία} <100 ψάρια, ασπόνδυλα

TER_{οξεία} <10 φύκη, υδρόβια φυτά

TER_{χρόνια} <10 ψάρια, ασπόνδυλα



Υπολογισμός Λόγου Τοξικότητας Έκθεσης (Toxicity Exposure Ratios, TERs) **TERs = LC₅₀ ή NOEC / PECs**

Υπολογισμός Πηλίκου Επικινδυνότητας (Hazard Quotient, HQ)

HQ = Δόση Εφαρμογής / LC₅₀ ή NOEC

Εκτίμηση Επικινδυνότητας (Risk Assessment)

Σύγκριση TER ή HQ με trigger values
(Annex VI of 91/414/EEC)



Trigger value met



Low risk

Trigger value not met

Refinement necessary



Λόγος Τοξικότητας Έκθεσης (TERs)

Οι τιμές 10 και 100 που καθορίστηκαν ως trigger values για τον λόγο TER με ποια κριτήρια επιλέχθηκαν?

Επιλέχθηκαν αυθαίρετα!!!! Αλλά ελήφθη υπόψη το πόσο καλά ξέρουμε τον βιολογικό κύκλο του κάθε οργανισμού δείκτη

Για τα φύκη η τιμή TER είναι 10 διότι γνωρίζουμε καλά τον βιολογικό κύκλο των φυκών και των υδρόβιων φυτών οπότε.....χαμηλότερη αβεβαιότητα (uncertainty) στις μετρήσεις μας



Τοξικότητα στα Πουλιά

Είδη

Bobwhite quail (*Colinus virginianus*)

Mallard duck (*Anas platyrhynchos*)

Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)

Τεστ

- Τεστ Οξείας Τοξικότητας

Χορήγηση μιας δόσης από το στόμα, 14-ημέρες παρακολούθηση (LD₅₀ mg/kg bw)

- Μεσοπρόθεσμα τεστ τοξικότητας με διατροφή

Τα πουλιά διατρέφονται με τροφή που περιέχει την υπό εξέταση ουσία για 5 ημέρες και ακολουθούν 3 ημέρες διάστημα ανάκαμψης

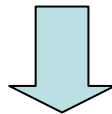
- Μακροχρόνια τεστ τοξικότητας με διατροφή

Τα πουλιά διατρέφονται με τροφή που περιέχει την υπό εξέταση ουσία για περίπου 22 εβδομάδες

Εκτίμηση της Έκθεσης για τα Πουλιά (Υπολογισμός ΕΤΕ)

Πηγές Έκθεσης:

- Καλλιεργούμενα φυτά ή άλλη ρυπασμένη βλάστηση
- Έντομα που έχουν εκτεθεί σε γεωργικά φάρμακα
- Γεωσκώληκες που έχουν εκτεθεί σε γεωργικά φάρμακα
- Ψάρια που έχουν εκτεθεί σε γεωργικά φάρμακα
- Αρπακτικά σπονδυλωτών που έχουν εκτεθεί σε γεωργικά φάρμακα
- Σπόροι επικαλυμμένοι με γεωργικά φάρμακα



Εκτιμώμενα Επίπεδα Θεωρητικής Έκθεσης (Estimated Theoretical Exposure)

Πως υπολογίζουμε τα Εκτιμώμενα Επίπεδα Θεωρητικής Έκθεσης (ETE) για τα πουλιά?

$$ETE = FIR/bw * C * AV * PD * PT$$

- ETE = Estimated theoretical exposure
- FIR = Food intake rate (g food/day)
- bw = Body weight of indicator bird/mammal (g)
- C = Concentration of compound in fresh diet (ppm)
- AV = Avoidance (default = 1)
- PT = Fraction diet obtained in treated area (default = 1)
- PD = Fraction of the food type in diet (default = 1)



Εκτίμηση του κινδύνου για πουλιά

Δεν δίνεται έγκριση για χρήση σε ένα γεωργικό φάρμακο που μετά από σύγκριση της έκθεσης με τις τοξικολογικές μετρήσεις ο λόγος TER έχει τιμές:

$$TER_{Acute} < 10$$

$$TER_{Short-Term} < 10 \text{ ή}$$

$$TER_{LongTerm} < 5$$



Τοξικότητα σε Υδρόβιους Οργανισμούς



- Οξεία τοξικότητα στα ψάρια (ψυχρά- and θερμά-νερά)
- Οξεία τοξικότητα σε υδρόβια ασπόνδυλα
 - *Daphnia magna*
 - Για εντομοκτόνα με συγκεκριμένο μηχανισμό δράση απαιτείται και τεστ με άλλα έντομα όπως *Chironomus*
- Επιδράσεις σε φύκη/φυτική ανάπτυξη υδροχαρών φυτών
 - *Selenastrum capricornutum* (φύκη)
 - Ζιζανιοκτόνα για την έγκριση των οποίων απαιτείται εξέταση και με επιπλέον είδη φυκών και υδροχαρή φυτά όπως *Lemna*
 - Για ζιζανιοκτόνα με συγκεκριμένο μηχανισμό δράση (μιμούνται την ενδογενή αυξίνη) απαιτούνται να γίνουν πειράματα και με άλλα είδη μακροφύτων (e.g. *Myriophyllum*)

Τοξικότητα σε Υδρόβιους Οργανισμούς

- Πειράματα με *Chironomus* σε ιζήματα απαιτείται για ουσίες που παρουσιάζουν:
 - Υψηλή πιθανότητα να καταλήξουν στο ίζημα των υδροφόρων συστημάτων (πειράματα έδειξαν ότι συγκεντρώσεις της ουσίας σε επίπεδα >10% της αρχικής ποσότητας συσσωρεύονται στο ίζημα)
 - Πιθανός κίνδυνος έκθεσης για ασπόνδυλα (*Daphnia* and/or *Chironomus acute data*)



Τοξικότητα σε Υδρόβια Φυτά

Είδη

Πράσινα φύκη (e.g. *Pseudokirchneriella subcapitata*)

Διάτομα (e.g. *Navicula pelliculosa*)

Μπλε-πράσινα Φύκη (e.g. *Anabaena flos-aquae*)

Duckweed (*Lemna gibba*)



Τέστ

- Τεστ αναστολής ανάπτυξης φυκών (ρυθμός ανάπτυξης)

Τεστ διάρκειας 72 ωρών, πειράματα για δύο είδη απαιτούνται σε περίπτωση που ελέγχονται ζιζανιοκτόνα. (0-72h E_rC_{50} mg/L)

- Τεστ Αναστολής ανάπτυξης Lemna (ρυθμός ανάπτυξης)

Τεστ διάρκειας 7 ημερών. Είναι απαραίτητο όταν η υπό αξιολόγηση ουσία είναι ζιζανιοκτόνο (7-day E_rC_{50} mg/L)

- Τεστ με επιπλέον είδη υδρόβιων μακροφύτων

Δικοτυλίδωνα είδη θα πρέπει να ελεγχθούν (e.g. *Myriophyllum*) όταν η υπό αξιολόγηση ουσία είναι ζιζανιοκτόνο με ορμονικό μηχανισμό δράσης.

Εκτίμηση Επικινδυνότητας για υδρόβιους οργανισμούς

Δεν δίνεται έγκριση για χρήση στις παρακάτω περιπτώσεις:

$TER_{Acute} < 100$ για ψάρια και ασπόνδυλα

$TER_{Acute} < 10$ για φύκη και *Lemna*

$TER_{LongTerm} < 10$ για ψάρια και ασπόνδυλα

Εάν από τις τιμές των TERs διαφανεί κίνδυνος τοξικότητας για υδρόβιους οργανισμούς τότε θα απαιτηθούν δεδομένα από σύνθετα πειράματα πεδίου (μικρόκοσμοι/μεσόκοσμοι) ή πιο σύνθετες μέθοδοι ανάλυσης (SSDs)

Τοξικότητα σε μέλισσες

Είδη

Μέλισσα (*Apis mellifera*)

Τεστ

- Πρώτο επίπεδο ανάλυσης - Οξεία τοξικότητα επαφής (θανάτωση)

Μια τοπική εφαρμογή (επαφής LD₅₀ µg/bee)

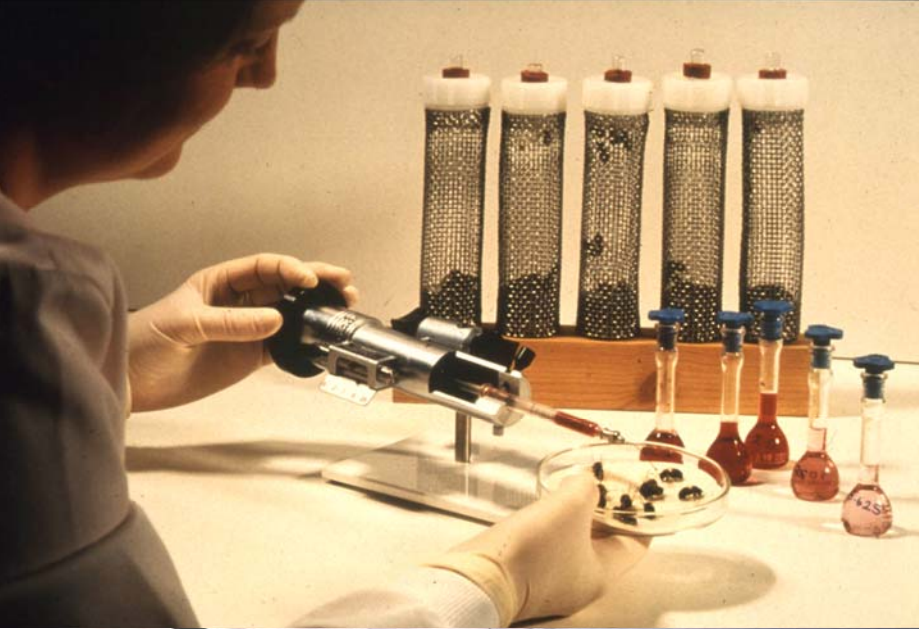
- Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης - Οξεία τοξικότητα προφορική (θανάτωση, αποφυγή)

Η ουσία διασπείρεται σε διάλυμα ζαχαρούχο στο οποίο διατρέφονται οι μέλισσες για 2-3 ημέρες (oral LD₅₀ µg/μέλισσα)

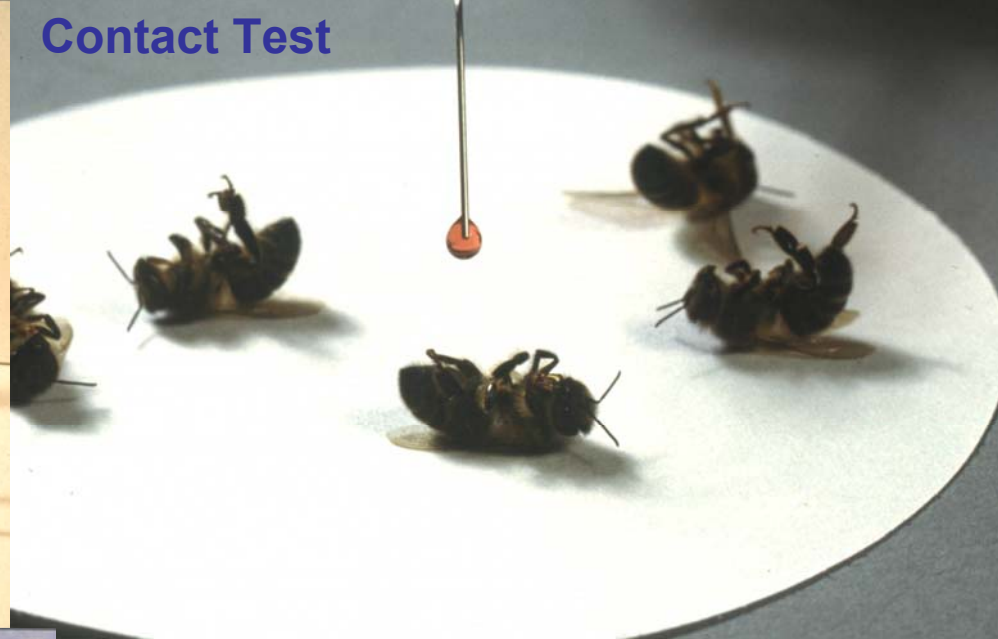
- Τρίτο επίπεδο ανάλυσης

Πειραματικές προσεγγίσεις πεδίου με κλουβιά, τούνελ για ουσίες που στα πρώτα στάδια ανάλυσης παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα.

Πιθανή η χρήση και πειραμάτων εκκόλαψης για εντομοκτόνα που δρουν ως παρεμποδιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators)



Contact Test



Tunnel Test

Χαμηλός κίνδυνος εάν

HQ_{oral} ή $HQ_{\text{contact}} < 50$



Τοξικότητα σε αρθρόποδα μη-στόχους

Είδη

Παρασιτοειδή έντομα (*Aphidius rhopalosiphii*)

Παρασιτοειδή ακάρεα (*Typhlodromus pyri*)

Τεστ

- Πρώτο επίπεδο ανάλυσης (Θανάτωση)

Τεστ Δόσης – αντίδρασης σε είδη δείκτες (*Aphidius* & *Typhlodromus*) με εφαρμογή σε ειδικές γυάλινες πλάκες (LR₅₀ g as/ha)

- Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης (θανάτωση, αναπαραγωγή, διατροφή)

Απαιτείται όταν η δόση της ουσίας είναι $> 2 \times \text{LR}_{50}$ για οργανισμούς δείκτες.

- Τρίτο Επίπεδο Ανάλυσης

Απαιτούνται όταν ο κίνδυνος όπως έχει υπολογιστεί στα δύο πρώτα στάδια είναι υψηλός

Τοξικότητα σε αρθρόποδα μη-στόχους

Εάν HQs < 2 τότε χαμηλή πιθανότητα κινδύνου

Εάν HQs > 2 τότε απαιτούνται νέα τεστ με ένα ή δύο από τα παρακάτω αρθρόποδα

➤ Επιφυτικά Είδη:

Chrysoperla carnea (green lacewing)

Coccinella septempunctata (ladybird)

Orius laevigatus (predatory bug)

➤ Εδαφικά Είδη:

Aleochara bilineata (rove beetle)

Pardosa spp. (lycosid spider)



Τοξικότητα σε γεωσκώληκες

Είδη

Γεωσκώληκες κομπόστας (*Eisenia foetida*)

Τεστ

- Πρώτο Επίπεδο Ανάλυσης - Τεστ Οξείας Τοξικότητας (θάνατος, ανάπτυξη)
14-ημέρες τεστ δόσης-αντίδρασης (dose-response test)
- Δεύτερο Επίπεδο Ανάλυσης – Sub-lethal test (θάνατος, ανάπτυξη, αναπαραγωγή)
Ενήλικα εκτίθενται σε προϊόντα στην επιφάνεια των οποίων έχει εναποτεθεί η υπό εξέταση ουσία για 28 ημέρες. Τα ενήλικα στην συνέχεια μεταφέρονται και τα νεογνά αφήνονται να μεγαλώσουν για άλλες 28 ημέρες.
- Τρίτο Επίπεδο Ανάλυσης
Πειράματα πεδίου (e.g. “litter bag*”) ή εργαστηρίου με περισσότερα είδη (e.g. *Collembola***) εάν από τα πειράματα πρώτου σταδίου διαφανεί πιθανότητα εκδήλωσης τοξικότητας σε γεωσκώληκες ή αρθρόποδα.

Τοξικότητα σε γεωσκώληκες

Εάν TER_{acute} < 10 ή TER_{long-term} < 5 τότε υπάρχει υψηλή πιθανότητα για τοξικότητα στους γεωσκώληκες οπότε θα απαιτηθούν νέα πειραματικά δεδομένα από πειράματα υψηλότερου επιπέδου πολυπλοκότητας και ανάλυσης



Εάν από την εκτίμηση επικινδυνότητας για τα αρθρόποδα μη-στόχους και τους γεωσκώληκες διαφανεί υψηλός κίνδυνος τοξικότητας για γεωργικά φάρμακα με υψηλή υπολειμματικότητα (100-365 ημέρες) τότε απαιτείται η πραγματοποίηση νέων πειραμάτων τοξικότητας για εδαφικούς οργανισμούς όπως

➤ **Κολλέμβολα (Collembola)**

➤ **Ακάρια (Gamasid mites)**

- Εάν $TERs > 5$ τότε χαμηλός κίνδυνος τοξικότητας
- Εάν $TERs < 5$ τότε απαιτείται η πραγματοποίηση σύνθετων πειραμάτων πεδίου (litter bag tests)

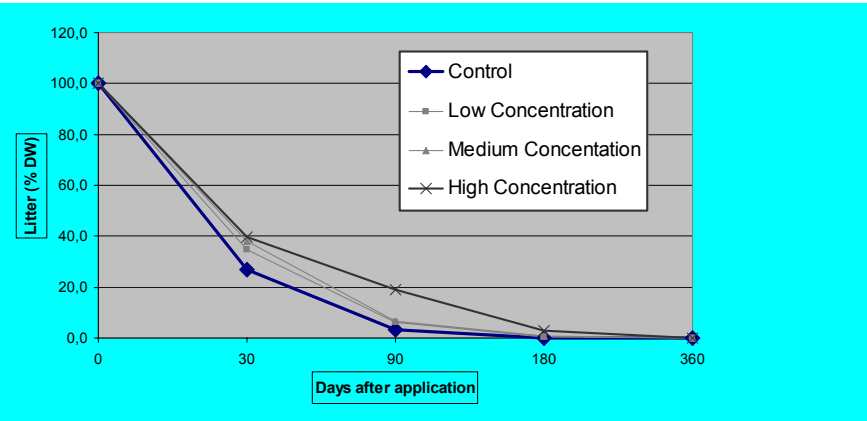
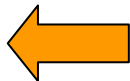
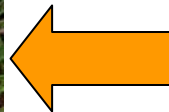
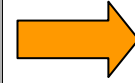
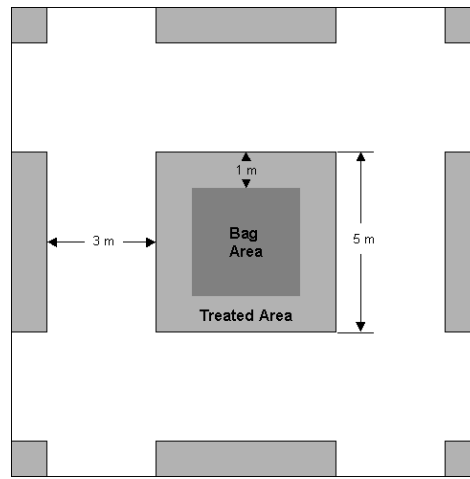
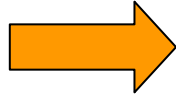


Litter Bag Studies

Στόχος: Να μετρήσει πιθανή επίδραση των γεωργικών φαρμάκων σε μακρο- ή μικροοργανισμούς του εδάφους που συμμετέχουν στην αποσύνθεση της νεκρής φυτικής ζωικής μάζας του εδάφους

Κύρια Χαρακτηριστικά

- Αποσύνθεση Οργανικής ουσίας που περιέχεται σε σακούλες από δίχτυ
- Οργανικά Υλικά: Άχυρο, φύλλα, κυτταρίνη ή ανάλογα
- Τρόπος Έκθεσης: Οι σακούλες τοποθετούνται επάνω ή εντός του εδάφους
- Διάρκεια: 1 – 12 μήνες
- Μέτρηση: απώλεια ξηρού βάρους
- Ανάλυση Αποτελεσμάτων: Σύγκριση της απώλειας μάζας στις σακούλες μεταξύ μάρτυρα και γεωργικού φαρμάκου



Πως αξιολογούμε τα αποτελέσματα των litter bags?

- 1) Διαφορά ξηρού βάρους στις σακούλες που προέρχονται από το τεμάχιο του μάρτυρα σε σχέση με αυτές που προέρχονται από τα τεμάχια που εκτέθηκαν στο γεωργικό φάρμακο είναι <math><10\%</math>.....**Δεν υπάρχει κίνδυνος Τοξικότητας**
2. 10-25%.....**Υπάρχει πιθανότητα εκδήλωσης Τοξικότητας και θα χρειαστούν και νέες μελέτες**
3. >25%.....**Υψηλός κίνδυνος Τοξικότητας και αναστολή έγκρισης του γεωργικού φαρμάκου**

Τοξικότητα σε μικροοργανισμούς

Είδη

Μικροοργανισμοί εδάφους

Μικροοργανισμοί λυματολάσπης

Τεστ

- Επίδραση σε μικροοργανισμούς εδάφους (ανάσχεση των κύκλων C- και N-) Εφαρμογή της προτεινόμενης δόσης και 5X την προτεινόμενη δόση και μέτρηση της μικροβιακής αναπνοής 28 ή 100 ημέρες αργότερα. Εάν διαφορά μικροβιακής αναπνοής μεταξύ μάρτυρα και του εδάφους που δέχτηκε εφαρμογή > 25% πιθανός κίνδυνος τοξικότητας
- Επίδραση σε μικροοργανισμούς που προέρχονται από λυματολάσπη (inhibition of respiration)
Αναστολή της αναπνοής μετράται ύστερα από 3 ώρες επαφής της ουσίας με την λυματολάσπη (3h EC₅₀).



Τοξικότητα σε φυτά μη - στόχους (όχι υδροχαρή)

Είδη

Ποικιλία 28 καλλιεργούμενων φυτών (ζιζάνια ή μη καλλιεργούμενα φυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν)

Τεστ

- **Πρώτο επίπεδο ανάλυσης** – Πειράματα με 6 τουλάχιστον είδη για εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα. Ζιζανιοκτόνα ελέγχονται κατευθείαν στο δεύτερο επίπεδο ανάλυσης. Trigger value >50% αρνητική επίδραση για ένα τουλάχιστον είδος.
- **Δεύτερο επίπεδο ανάλυσης** - Πειράματα Δόσης-αντίδρασης με 6-10 είδη. Επιλογή των ειδών θα πρέπει να είναι αντικειμενική με ιδιαίτερη προσοχή στον μηχανισμό δράσης των ζιζανιοκτόνων
- **Τρίτο επίπεδο ανάλυσης** – Πειράματα πεδίου



Τι γίνεται εάν στο πρώτο επίπεδο ανάλυσης εντοπιστεί κίνδυνος?

Απαιτείται ανάλυση σε υψηλότερο επίπεδο ή νέα πειραματικά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει ρεαλιστικός κίνδυνος για το περιβάλλον

