

A PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Neonikotinoid-indukált viselkedési és biokémiai
változások a kétpúpos bolharák (*Dikerogammarus
villosus*) tesztállatban**

Készítette:

Somogyvári Dávid

Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

Témavezetők:

Prof. Dr. Padisák Judit

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar,

Természettudományi Központ, Limnológia Kutatócsoport, Veszprém

Dr. Győri János

Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Ökofiziológiai és Környezettoxikológiai Kutatócsoport,

Tihany

Pannon Egyetem

Limnológia Kutatócsoport



Veszprém

2024

I. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A környezeti problémák napjainkra igen összetetté váltak. Egyik ilyen a túlnépesedés miatt bekövetkező élelmezési válság. A különböző növényvédő szerek (peszticidek) használata mára a mindennapjaink részévé vált. Ezek a vegyületek fontos szerepet játszanak a mezőgazdaságban, mind a hozam növelése, mind pedig az élelmiszer-előállítás költségeinek csökkentése okán. Segítik az intenzív gazdálkodást, támogatják a védekezést a különböző patogénekkal szemben. Ugyanakkor, a túlzott mértékű peszticid felhasználás következtében a talajban és a felszín alatti vízbázisokban akkumulálódott szermaradványok a meteorológiai és geológiai folyamatok révén a felszíni víztestekbe juthatnak, ahol adszorpciós mechanizmusok által akkumulálódhatnak, illetve megfelelő körülmények hatására deszorbeálódhatnak. Amennyiben nagy mennyiségben és az élőlények számára felvehető formában vannak jelen a peszticidek a természetes vizekben, a lokális ökoszisztémák, valamint a tápláléklánc természetes egyensúlya felborulhat. Ez szélsőséges esetben az élőhelyek beszűküléséhez és a biodiverzitás csökkenéséhez is vezethet. Ezért különösen fontos tanulmányozni, hogy a világviszonylatban legnagyobb mennyiségben használt rovarölő szereknek, a neonikotinoidoknak, milyen koncentrációfüggő fiziológiás hatásai vannak az egyes gerinctelen és gerinces fajok esetében. A bekövetkező negatív hatások a szárazföldi gerinctelen fajok esetében mutatkoznak meg legszembetűnőbben. Ennek ékes bizonyítékai a méhkolóniák világszerte régóta tapasztalható pusztulása. A szárazföldön könnyebben és nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben juthatnak be az élőlények szervezetébe a növényvédő szerek, mint a vízi környezetben. Az is ismeretes, hogy a gerinctelen szervezetek szignifikánsan nagyobb érzékenységet mutatnak a peszticidek ezen csoportjával történő kontamináció esetén. Tehát a gerinctelen, a táplálékláncok alsó szintjein elhelyezkedő elsődleges-másodlagos fogyasztó organizmusok vizsgálata ablakot nyithat arra, hogy egy környezetidegen anyag milyen hatást gyakorol az adott ökoszisztémára. Azonban a vízi gerinctelen fajokról mindmáig keveset tudunk ebben a tekintetben. Nem rendelkezünk elegendő mennyiségű és minőségű információval ahhoz,

hogy hatékony környezetvédelmi intézkedéseket teheünk, jogszabályokat alkothassunk. A neonikotinoidok vonatkozásában bebizonyosodott, hogy nem elegendő haltesztek (pl. tűzcelle [*Pimephales promelas* Kendall, 1903], kékkopoltyús naphal [*Lepomis macrochirus* Rafinesque, 1819], pettyes harcsa [*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818], szivárványos pisztráng [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)]), vagy nagy vízibolha (*Daphnia magna* Straus, 1920) tesztek végezni, mert ezek a fajok nem elég érzékenyek az említett vegyületcsoport viselkedési és biokémiai hatásainak pontos tanulmányozásához, azaz csak magasabb koncentráció-tartományban mutatnak válaszreakciókat.

A disszertációban egy neonikotinoid kontaminációra igen érzékeny balatoni felsőrendű rákfaj, a kétpúpos bolharák (*Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894)) szolgál tesztszervezetként, mely által betekintést nyerünk azokba a folyamatokba, melyek megismerése és a kísérleti alanyon végzett vizsgálatok eredményei hiánypótló adatokat és ismereteket nyújthatnak a vizsgált anyagok ökotoxikológiai profijának leírásához, illetve azok környezeti kockázatértékeléséhez egyaránt.

A neonikotinoidokat nagymértékű használatuk és perzisztenciájuk miatt gyakran mutatják ki talajszennyező anyagként, de az utóbbi időben a felszíni vizekben is megjelentek, és kimutathatóságuk gyakorisága magas, koncentrációjuk pedig széles határok között változik (ng/l- μ g/l), ezért hosszútávon nem várt ökológiai hatásokat mutatnak. Míg a neonikotinoidok szerepének tisztázása a beporzók tömeges pusztulásában valamint az újonnan kialakuló méhbetegségekben az intenzív kutatások központjába került, addig kevesebb adat áll a rendelkezésünkre a vízi nem célszervezetek esetében. Ez készítetett minket arra, hogy Közép-Európa legnagyobb édesvízi sekély tavában, a Balatonban egy nagyszámban előforduló invazív fajt vegyünk górcső alá.

Kérdések, melyekre választ kerestünk:

1. Milyen viselkedésbeli változásokat idéznek elő a legnépszerűbb neonikotinoid hatóanyagok a *D. villosus* testállatban?
2. Milyen biokémiai elváltozások vezetnek a társas és individuális viselkedésformák megváltozásához?

Kitűzött célok:

1. Megvizsgálni a toxikus hatásokat vízi tesztszervezeten laboratóriumi körülmények között hosszú távon alacsony koncentrációkban. Mérési végpontjaink a konvencionálisan gyakran alkalmazott letalítás, és/vagy immobilitás, szaporodóképesség, valamint szubletális hatások (például mozgás, táplálkozási aktivitás).
2. Megfigyelni a detoxifikálás folyamatában fontos szerepet játszó kulcs biomarkereket, így többek között az oxidatív stresszt, valamint az MXR aktivitás változását.
3. Meghatározni az aktív komponensek, valamint a lebomlási termékek mennyiségét korszerű analitikai-kémiai módszerek segítségével.

II. ALKALMAZOTT KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

A kísérleti alanyok begyűjtése a Balaton litorális régiójából, a Tihanyi-félszigeten történt. 10 literes közepes méretű köveket és kvagga kagylókat tartalmazó kádakban, szűretlen levegőztetett balatonvízben tartottuk a bolharák egyedeket. Etetésük sárgarépával ad libitum történt. A viselkedésvizsgálatok rögzített kisfilmek alapján, Fiji ImageJ szoftveres elemzéssel készültek.

Az MXR mérésekhez meghatároztuk az egyedek teljes fehérjetartalmát Bradford- módszerrel. A GST-aktivitás meghatározását a Sigma-Aldrich módszer alapján végeztük. Az AChE-aktivitás meghatározása az Ellman-módszerrel történt. A statisztikai elemzéseket OriginPro szoftverrel végeztük.

III. EREDMÉNYEK TÉZISSZERŰ ÖSSZEFOGLALÁSA

Vizsgálatainkban különböző neonikotinoid rovarölőszer hatóanyagokat vettünk górcső alá. Ezek voltak a KLO, az IMI és a TIAK. A KLO és a TIAK esetében sor került kereskedelmi forgalomban 2018-ig, illetve 2020-ig kapható formázott szer exponálására is. IMI-t tartalmazó szerhez nem jutottunk hozzá. A vizsgált végpontok a viselkedés tekintetében az immobilitási időtartam és az úszásaktivitás, biokémiai vonatkozásban a GST és az AchE enzimaktivitás-vizsgálatok voltak.

Az APACS 50 WG a kísérleti alany immobilitási időtartamra vonatkozó viselkedését már 3,9 ng/l koncentrációban szignifikánsan csökkentette.

A vegytiszta KLO viselkedésvizsgálatából kiderült, hogy az immobilitási időtartamot és az úszási aktivitást is szignifikánsan csökkentette abnormális viselkedési mintázatok előidézése mellett környezeti és magasabb koncentrációban minden kezelt csoportnál (16, 32, 48 µg/l).

A tiszta IMI a környezeti koncentrációnál magasabb tartományban eredményezett abnormális viselkedésformákat, szignifikánsan csökkentette előbb az úszásaktivitást (20, 80 µg/l), majd a mozdulatlansági időtartamot (250 µg/l) a kontrollhoz képest.

A tiszta TIAK szignifikánsan növelte az immobilitási időt a környezeti koncentrációnál nagyobb töménységben (100 µg/l), bár nem okozott oly mértékű abnormalitást a viselkedésben, mint a KLO, vagy az IMI.

A Calypso 480 SC, mint formázott TIAK került exponálásra. Az immobilitási időtartamot a tiszta szernél harmadával kisebb töménységben (30-100 µg/l) is képes szignifikánsan növelni.

A kutatás biokémiai vonatkozásában elmondható, hogy az MXR mechanizmusban bekövetkezett szignifikáns kemostimulációt az APACS 50 WG KLO-tartalmú inszekticid mindössze 4,5 ng/lkoncentrációban, már 1,5 óra expozíció alatt is képes kifejteni.

GST tekintetében tiszta KLO exponálásakor nem mutattak szignifikáns eltérést egyik kezelt csoportban sem (16, 32, 48 µg/l), azonban a tiszta IMI magasabb kezelési koncentrációknál (160, 250 µg/l) szignifikáns növekedés figyelhető meg az enzimaktivitásban. A tiszta TIAK nem váltott ki szignifikáns változást a méregtelenítés ezen fázisában, de a Calypso 480 SC 10 és 30 µg/l töménységben szignifikánsan növelte a GST aktivitást. Az AchE enzimaktivitás-változást meghatározva kimutattuk, hogy a KLO minden kezelt csoportban (160, 250 µg/l) szignifikánsan csökkentette az ingerületvezetést, míg az IMI a töményebb kezelési koncentrációk exponálásakor (80, 160, 250 µg/l) szignifikánsan serkentette azt. A TIAK nem váltott ki szignifikáns elváltozást az ingerületvezetésben, a Calypso 480 SC viszont 10, 30 és 100 µg/l kezelési csoportoknál szignifikáns blokkoló hatással bír.

Kimutattuk azt is, hogy amennyiben a kísérleti alany fogságban tartva nem táplálható a természetes eleségével, akkor alternatív táplálékokkal történő etetés toxikológiai szempontok figyelembevételével, ellenőrzés mellett igenis lehetséges. Esetünkben a sárgarépa táplálék antioxidáns tartalma nem befolyásolta szignifikánsan a vizsgálatok toxikológiai végkimenetelét.

1. Az APACS 50WG KLO-t tartalmazó rovarölőszer:

- 3,9 ng/l koncentrációban 3 óra kezelési idő alatt szignifikánsan csökkentette a kísérleti alanyok immobilitási időtartamát
- 4,5 ng/l koncentrációban 1,5 óra kezelési időtartam alatt szignifikánsan fokozta az MXR sejtszintű védekező-mechanizmus működését

2. A tiszta KLO:

- minden kezelési csoportban (16, 32, 48 µg/L) szignifikánsan csökkentette mind az immobilitási időt, mind az úszási aktivitást
- nem eredményezett szignifikáns változásokat a GST enzimaktivásban egyik kezelt csoportban sem (16, 32, 48 µg/L)
- minden kezelt csoportban (16, 32, 48 µg/L) szignifikáns AChE enzimaktivitás gátlást okozott

3. A tiszta IMI:

- alacsonyabb kezelési koncentrációkban (20, 80 µg/L) az úszási aktivitást, míg töményebb oldatokban történő expozíció során az immobilitási időt csökkentette szignifikáns mértékben
- töményebb médiában (160, 250 µg/L) szignifikáns GST enzimaktivitás-emelkedést váltott ki
- töményebb oldatokban (80, 160, 250 µg/L) szignifikánsan serkentette az AChE aktivitást.

4. A TIAK-tartalmú Calypso 480 SC rovarölőszer:

- a tiszta formához hasonló változásokat indukált, azonban már 30 µg/l töménységű médium is szignifikáns növekedést eredményezett az immobilitási időtartamban

- 10 és 30 µg/l töménységű kezelésekben szignifikánsan serkentette a GST-aktivitást
- szignifikánsan gátolta az ingerületvezetést a 10, 30, 100 µg/l töménységű kezelt csoportokban

5. A tiszta TIAK:

- a kontrollhoz képest 100 µg/l kezelési koncentrációig egyre növekvő mértékben 100 µg/l-nél pedig már szignifikánsan növelte az immobilitási időtartamot a kezelt egyedeknél
- nem befolyásolta szignifikáns mértékben a GST-általi detoxifikációt egyik kezelt csoportban sem (10, 30, 100, 250 µg/L)
- hatására nem következett be szignifikáns változás az AChE-aktivításban egyik kezelt csoportban sem (10, 30, 100, 250 µg/L)

IV. A KUTATÁS JELENTŐSÉGE

Jelen doktori (PhD) kutatómunka során egy, a Balatonban (Közép-Európa legnagyobb sekélyvizű tava) nagyszámban előforduló felsőbbrendű rákfaj, a *Dikeroгамmarus villosus* felnőtt egyedeit tanulmányoztuk a tekintetben, hogy milyen mértékű viselkedési és biokémiai változásokat idéz elő a különböző neonikotinoid rovarölő szereknek való rövidtávú kitettség.

Azért ezt a fajt választottuk, mert a tesztelt szerek vonatkozásában nem célszervezetnek tekinthető, valamint napjainkig világszerte kevés ökotoxikológiai vizsgálat kísérleti alanya volt, mindezek miatt kutatásunk hiánypótló mivoltát kívánom hangsúlyozni.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a szakirodalomban fellelhető vizsgált nem célfajokhoz hasonlóan a *D. villosus* is igen érzékeny a neonikotinoid vegyületek általi kontaminációra. Jelenlegi tudásunk szerint a vízi rák és rovarszervezetek számítanak a legérzékenyebbek a neonikotinoid terhelés tekintetében. Ez azt jelenti, hogy a hosszútávú (hónapok, évek)

kitettség az ökoszisztémák nagymértékű károsodásához, eltűnéséhez vezethet. Ezért alkalmas lenne a *D. villosus* a modellszervezetté történő nyilvánításra.

Tudomásunk szerint a jelen dokumentumban leírtak az első olyan vizsgálat sorozatot képezik, melyben az általunk alkalmazott kísérleti alanyon neonikotinoid inszekticidek ökotoxikológiai tesztelését végezték akut kezelések során, környezeti releváns és magasabb koncentrációban.

Munkánkkal szeretnénk felhívni a figyelmet a vízi testállatokkal történő ökotoxikológiai tesztek jelentőségére, valamint arra, hogy milyen fontos a növényvédő-szerek szelektivitásának növelése és az érzékeny fajok keresése. Ezen célok eszközéül szolgálhat a környezeti kockázatbecslések és a felszíni vizekre vonatkozó irányelvek rendszeres felülvizsgálata.

V. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

- Somogyvári, D., Vehovszky, Á., Farkas, A., Horváth, R., and Gyóri, J. (2020). Multi-marker approach for the evaluation of environmental impacts of APACS 50WG on aquatic ecosystems. *Invertebrate Neuroscience* 20:4, 20(4), 1–3.
<https://doi.org/10.1007/S10158-020-00254-2>. IF: 1,38
- Somogyvári, D., Farkas, A., Mörtl, M., and Gyóri, J. (2022). Behavioral and biochemical alterations induced by acute clothianidin and imidacloprid exposure in the killer shrimp, *Dikerogammarus villosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 261: 109421.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109421>. IF: 4,39

VI. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PREZENTÁCIÓK

- 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, 2019. augusztus 13-17, Tihany
Multi-marker approach for the evaluation of environmental impacts of xenobiotics on aquatic ecosystems. David Somogyvári, Ágnes Vehovszky, Anna Farkas, János Győri
MTA Ökológiai Kutatóközpont, Balatoni Limnológiai Intézet
- IX. Ökotoxikológiai Konferencia, 2019. november 22, Budapest
Multiparaméteres megközelítés a rovarölő szerek környezeti hatásának értékeléséhez a *Dikerogammarus villosus* felemáslábú rákfaj példáján. Somogyvári Dávid, Farkas Anna, Vehovszky Ágnes, Győri János
- Tudományos Konferencia, 2020 szeptember 16, Veszprém
Különböző környezetszennyezők (rovarölő szerek, nanoanyagok, endokrin diszruptorok) környezeti hatásának vizsgálata vízi ökoszisztémákon. Somogyvári Dávid
- Pannon Tudományos Napok - Magyar Tudomány Ünnepe, 2020. november 16-17.
A neonikotinoidok környezeti hatásának vizsgálata vízi ökoszisztémákon. Somogyvári Dávid
- X. Ökotoxikológiai Konferencia, 2020. december 4.
Az Apacs 50 WG hatásának vizsgálata a *Dikerogammarus villosus* rákfajon.
Somogyvári Dávid
- XI. Ökotoxikológiai Konferencia, 2021. november 26.
A clothianidin és az imidacloprid hatásának vizsgálata kétpúpos bolharák (*Dikerogammarus villosus*) célszervezeten. Somogyvári Dávid, Farkas Anna, Győri János
- TOX'2022 Tudományos Konferencia, 2022.10.12-14, Zalakaros
Neonikotinoid-indukált viselkedési és biokémiai változások a *Dikerogammarus villosus* testállatban. Somogyvári Dávid

VII. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- Ács, A., Komáromy, A., Kovács, A. W., Fodor, I., Somogyvári, D., Győri, J., A., Farkas. (2023). Temperature related toxicity features of acute acetamiprid and thiacloprid exposure in implications on reproductive performance. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 268: 109601
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109601>
- Farkas, A., Somogyvári, D., Kovács, A. W., Mörtl, M., Székács, A., and Győri, J. (2022). Physiological and metabolic alterations induced by commercial neonicotinoid formulations in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 31(3), 415–424.
<https://doi.org/10.1007/s10646-022-02520-y>