

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

Doktori (PhD) értekezés



Somogyvári Dávid

DOI:10.18136/PE.2025.920

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

Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

Veszprém, 2024

Neonikotinoid-indukált viselkedési és biokémiai változások

a kétpúpos bolharák (*Dikerogammarus villosus*) tesztállatban

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája és a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet
keretében

Környezettudományok tudományágban

Írta: Somogyvári Dávid

Témavezetői: Prof. Dr. Padisák Judit és Dr. Győri János

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
(témavezető)

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
(témavezető)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el.
Veszprém,

.....
a Bíráló Bizottság Elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése
Veszprém,

.....
az EDHT elnöke

Szüleimnek

Tartalomjegyzék

KIVONAT	6
ABSTRACT	8
ZUSAMMENFASSUNG	10
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	12
I. BEVEZETÉS	14
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	16
II/1. A peszticidek	16
II/2. A neonikotinoidok	16
II/5. A neonikotinoidok használatának előnyei	25
II/6. A neonikotinoidok hátrányai	28
II/6/1. A neonikotinoidok környezeti előfordulása és toxicitása.....	31
II/6/2. A neonikotinoidok ökotoxicitása.....	40
II/7. A kísérleti állat	52
II/7/1. A kétpúpos bolharák (<i>Dikero gammarus villosus</i>) bemutatása – alkalmazásának okai 52	
II/7/2. Elterjedési területe, kültakarója, táplálkozása	54
VI/2. Jövőbeli kilátások - környezeti kockázat, helyettesítés, fenntartható kártevőirtás – EASAC jelentések alapján	55
III. CÉLKITŰZÉS	57
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	60
IV/1. A kétpúpos bolharák példányok begyűjtése.....	60
IV/2. A kétpúpos bolharák tartása.....	60
IV/3. A neonikotinoidok visszamérése a kezelések során	61
IV/4. Viselkedési vizsgálatok jellemzése	61
IV/2. A kísérleteink során felhasznált vegyszerek	63
IV/5. Teljes fehérjetartalom és enzimaktivitás meghatározása	64
IV/6. MXR vizsgálat leírása	65
IV/7. GST aktivitás meghatározása.....	67
IV/8. AChE aktivitás meghatározása	69
IV/9. Statisztikai elemzés	69

V. EREDMÉNYEK	71
V/1. A Neonikotinoid-nak kitett <i>Dikerogammarus villosus</i> viselkedésbeli változásai.....	71
V/2. A Neonikotinoid-nak kitett <i>Dikerogammarus villosus</i> biokémiai változásai	79
VI. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	87
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	99
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	102
IX. IRODALOMJEGYZÉK	104
X. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ADATAI	127
X/1. Az értekezés témájához kapcsolódó idegen nyelvű közlemények.....	127
X/2. Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó egyéb közlemények	128
X/3. Az értekezés témájához kapcsolódó magyar és idegen nyelvű prezentációk	128
XI. EREDMÉNYEK TÉZISSZERŰ ÖSSZEFOGLALÁSA	129
XII. RESULTS OF THE STUDIES	131
XIII. FÜGGELÉK	133

KIVONAT

A doktori értekezésben bemutatott kutatás célja volt, hogy feltárja a felszíni víztestekben világszerte kimutatható mennyiségben jelen lévő növényvédőszer-csoport - a neonikotinoidok – milyen viselkedési és biokémiai változásokat idéznek elő egy, a Balatonban igen nagyszámban előforduló gerinctelen szervezeten, a kétpúpos bolharák (*Dikerogammarus villosus*) rákfajon.

A doktorjelölt dolgozatában bemutatja a neonikotinoidok globális előfordulását, előnyeit, a hátrányok között kiemelendő ökotoxikus hatásokat, melyek az elvégzett munka tárgyát képezik.

A doktorjelölt munkája során a *D. villosus* tekintetében egyedi tartási körülményeket dolgozott ki, majd megfigyelte a *clothianidin* az *imidacloprid*, és a *thiacloprid* neonikotinoid hatóanyagok hatásait környezetileg releváns és magasabb koncentrációkban akut tesztek során.

Kiderült, hogy a választott kísérleti tesztállat életfunkcióit és vitalitását a neonikotinoid kontamináció szignifikánsan nagyobb mértékben befolyásolta, mint a korábbi vizsgálatokban alkalmazott ökotoxikológiai modellszervezetek hasonló vizsgált végpontjait. Ilyen modellszervezetek többek között: *Daphnia magna* [Straus, 1820], *Danio rerio* [F. Hamilton, 1822], *Lepomis macrochirus* [Rafinesque, 1810], *Ictalurus punctatus* [Rafinesque, 1818], *Oncorhynchus mykiss* [Walbaum, 1792]). Az egyedek mozgási aktivitását az APACS 50 WG elnevezésű rovarölő szer már 3,9 ng/l koncentrációban befolyásolja, de a tiszta formájú *clothianidin* hatóanyag is már 16 µg/L töménységben szignifikáns változásokat idéz elő a viselkedésben. Az *imidacloprid* és a *thiacloprid* tiszta formában egy nagyságrenddel magasabb kezelési koncentráció esetén eredményeznek szignifikáns elváltozásokat. A *thiacloprid* esetében a formázott rovarölőszer jóval gyengébb hatásokat váltott ki a

teszalanyon, minthogy csak 3 nagyságrenddel nagyobb koncentráció eredményezett szignifikáns viselkedésbeli abnormalitást.

A doktorjelölt munkája során megfigyelte a *D. villosus* élettani sajátosságait, beleértve a viselkedési mintázatokat, a méregtelenítésért, valamint az ingerület-átvitelért felelős mechanizmusok és enzimek működésében végbemenő változásokat is. A Multixenobiotikus Rezisztencia rendszer működését vizsgálva fény derült arra, hogy a *clothianidin* hatóanyag tartalmú APACS 50 WG már 2,7 ng/L koncentrációban is képes aktiválni a mechanizmust. A glutation S-transzferáz enzim *imidacloprid* általi szignifikáns aktiválásához ≤ 160 $\mu\text{g/L}$ koncentráció szükséges. Az acetilkolin-észteráz enzim aktivitásában bekövetkező szignifikáns változások eléréséhez az *imidacloprid*ből ≤ 80 $\mu\text{g/L}$, míg a *clothianidin*ből 16 $\mu\text{g/L}$ már elegendő. A *thiacloprid* hatóanyagot tartalmazó Calypso 480 SC 10 $\mu\text{g/L}$ -től váltja ki szignifikáns mértékben a Glutation-S-transzferáz és az Acetilkolin-észteráz aktivitásának változásait.

ABSTRACT

The aim of the research presented in the doctoral thesis was to reveal the behavioral and biochemical changes caused by plant protection agents - neonicotinoids - which are present in detectable quantities in surface water bodies worldwide, in an invertebrate organism that occurs in large numbers in Lake Balaton, the crab species *Dikerogammarus villosus*.

In his dissertation, the doctoral candidate presents the global occurrence of neonicotinoids, their advantages, their market share, and the ecotoxic effects to be highlighted among the disadvantages, which are the subject of the completed work.

During his work, the doctoral candidate developed unique housing conditions for *D. villosus* and then observed the effects of the neonicotinoid active substances clothianidin, imidacloprid and thiacloprid in environmentally relevant and higher concentrations during acute tests.

It was found that the vital functions and vitality of the chosen test animal were significantly more affected by neonicotinoid contamination than similar endpoints in ecotoxicological model organisms used in previous studies. Such model organisms include: *Daphnia magna* [Straus, 1820], *Danio rerio* [F. Hamilton, 1822], *Lepomis macrochirus* [Rafinesque, 1810], *Ictalurus punctatus* [Rafinesque, 1818], *Oncorhynchus mykiss* [Walbaum, 1792]. After all, the movement activity of individuals is affected by the Apacs 50 WG insecticide at a concentration of 3.9 ng/l, but the active substance clothianidin in its pure form also causes significant changes in behavior at a concentration of 16 µg/l. Imidacloprid and thiacloprid in

their pure form result in significant changes at an order of magnitude higher treatment concentration. In the case of thiacloprid, the formulated insecticide had much weaker effects on our test subject, because a concentration 3 orders of magnitude higher resulted in significant behavioral abnormalities.

During his work, the doctoral candidate observed the physiological characteristics of *D. villosus*, including behavioral patterns, changes in the functioning of the mechanisms and enzymes responsible for detoxification and neurotransmission. Examining multixenobiotic resistance mechanism (MXR) revealed that Apacs 50 WG can activate the mechanism even at a concentration of 2.7 ng/l. Significant activation of Glutathione-S transferase (GST) by imidacloprid requires a concentration of at least 160 µg/l. No significant differences were observed between the control and *clothianidin*-treated groups. At least 80 µg/l of imidacloprid and only 16 µg/l of *clothianidin* are sufficient to achieve significant changes in acetylcholine-esterase (AChE) activity. Calypso 480 SC induces significant changes in both GST and AChE activity from 10 µg/l.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der in der Doktorarbeit vorgestellten Forschung bestand darin, die Verhaltens- und biochemischen Veränderungen aufzudecken, die durch Pflanzenschutzmittel – Neonicotinoide – verursacht werden, die weltweit in nachweisbaren Mengen in Oberflächengewässern vorkommen, und zwar bei einem wirbellosen Organismus, der im Plattensee in großer Zahl vorkommt, die Krabbenart *Dikerogammarus villosus*.

In seiner Dissertation stellt der Doktorand das weltweite Vorkommen von Neonicotinoiden, ihre Vorteile, ihren Marktanteil und die unter den Nachteilen hervorzuhebenden ökotoxischen Wirkungen dar, die Gegenstand der abgeschlossenen Arbeit sind.

Während seiner Arbeit entwickelte der Doktorand einzigartige Haltungsbedingungen für *D. villosus* und beobachtete anschließend bei Akuttests die Wirkung der Neonicotinoid-Wirkstoffe Clothianidin, Imidacloprid und Thiacloprid in umweltrelevanten und höheren Konzentrationen.

Es wurde festgestellt, dass die Lebensfunktionen und die Vitalität des ausgewählten Versuchstieres durch die Neonicotinoid-Kontamination deutlich stärker beeinträchtigt wurden als ähnliche Endpunkte bei ökotoxikologischen Modellorganismen, die in früheren Studien verwendet wurden. Zu diesen Modellorganismen gehören: *Daphnia magna* [Straus, 1820], *Danio rerio* [F. Hamilton, 1822], *Lepomis macrochirus* [Rafinesque, 1810], *Ictalurus punctatus* [Rafinesque, 1818], *Oncorhynchus mykiss* [Walbaum, 1792]). Denn zwar wird die Bewegungsaktivität von Individuen durch das Insektizid Apacs 50 WG in einer Konzentration von 3,9 ng/l beeinträchtigt, doch auch der Wirkstoff Clothianidin in seiner reinen Form führt bei einer Konzentration von 16 µg/l zu deutlichen Verhaltensänderungen. Imidacloprid und Thiacloprid in ihrer reinen Form führen bei einer um eine Größenordnung

höheren Behandlungskonzentration zu signifikanten Veränderungen. Im Fall von Thiacloprid hatte das formulierte Insektizid bei unserem Probanden eine viel schwächere Wirkung, da eine um drei Größenordnungen höhere Konzentration zu erheblichen Verhaltensstörungen führte.

Während seiner Arbeit beobachtete der Doktorand die physiologischen Eigenschaften von *D. villosus*, darunter Verhaltensmuster, Veränderungen in der Funktion der Mechanismen und Enzyme, die für die Entgiftung und Neurotransmission verantwortlich sind. Die Untersuchung von Mechanismus der Multixenobiotikaresistenz (MXR) ergab, dass Apacs 50 WG den Mechanismus bereits in einer Konzentration aktivieren kann von 2,7 ng/l. Für eine signifikante Aktivierung von Glutathion-S-Transferase (GST) durch Imidacloprid ist eine Konzentration von mindestens 160 µg/l erforderlich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der mit Clothianidin behandelten Gruppe beobachtet. Mindestens 80 µg/l Imidacloprid und nur 16 µg/l Clothianidin reichen aus, um signifikante Veränderungen der Acetylcholin-Esterase (AChE) Aktivität zu erreichen. Calypso 480 SC induziert ab 10 µg/l signifikante Veränderungen sowohl der GST- als auch der AChE-Aktivität.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACh: acetilkolin

AChE: acetilkolin-észteráz

ACT: acetamiprid

CCD: kolónia-összeomlási rendellenesség (*colony collapse disease*)

DNF: dinotefurán

EASAC: Európai Akadémiák Tudományos tanácsadó testülete (European Academies' Science Advisory Council)

EC₅₀: közepes hatásos koncentráció; annak a koncentrációnak az értéke, amelynél a teszt-szervezetek 50%-nál megfigyelhető hatás.

EFSA: Európai Élelmiszerbiztonsági hivatal (European Food Safety Agency)

EPA: Környezetvédelmi Ügynökség (Environmental Protection Agency)

GST: glutation S-transzferáz

IMI: *imidacloprid*

KLO: *clothianidin*

LAS: lineáris-alkilbenzol származékok

LC₅₀: közepes letális koncentráció; annak a koncentrációnak az értéke, amelynél a teszt-szervezetek 50% -os pusztulása figyelhető meg

LD₅₀: közepes letális dózis; amelynél egyszeri kezelés esetén a teszt-szervezetek 50% -os pusztulása figyelhető meg (mg/kg testtömegre vonatkoztatva)

mrd: milliárd

MXR: multixenobiotikus rezisztencia

nAChR: nikotin-típusú acetilkolin receptorok

NIP: nitenpirám

NOAEL: az a legnagyobb dózis, amely még nem okoz megfigyelhető káros hatást (No Observed Adverse Effects Level)

TIAK: *thiacloprid*

TIAM: tiametoxám

USEPA: Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency)

USGS: Amerikai Egyesült Államok Földtani Ügynöksége (United States Geological Survey)

I. BEVEZETÉS

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 tehesünk, jogszabályokat alkothassunk. A neonikotinoidok vonatkozásában bebizonyosodott, hogy nem elegendő halteszketet (pl. tűzcselle [*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) teszketet 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 kétpúpós 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.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II/1. A peszticidek

A növényvédő szerek (peszticidek) olyan mesterségesen előállított kémiai anyagok, amelyeket elsősorban a mezőgazdaságban alkalmaznak a termények védelme és a termés hozam növelése érdekében. A kártevők elriasztását vagy megölését teszik lehetővé ezzel védve a haszonnövényeket a különböző betegséget okozó virulens ágensek, élősködők, kompetítorok ellen (Richardson és mtsai., 2019; Borsuah és mtsai., 2020). A peszticidek tovább osztályozhatóak a célszervezetek szerint. Főbb csoportjaik az inszekticidek (rovarellenes szerek), a herbicidek (gyomirtók) és a fungicidek (gombaölők) (Goulson, 2013; Hladik és mtsai., 2014; Mahai és mtsai., 2019; Borsuah és mtsai., 2020). Az inszekticidek kereskedelmi forgalomba kerülő termékkörének hatóanyagai a piretroid, organofoszfát és karbamát vegyületek voltak a neonikotionidok megjelenése előtt (Jeschke et al., 2011). A vegyipari fejlesztéseknek köszönhetően azonban nagy áttörés következett be a kártevők elleni védekezésben. Olyan vegyszerek jelentek meg, amelyek a meglévőknél hatékonyabbak a kártevőkkel szemben, mind hatástartam, mind hatásintenzitás szempontjából, ezen kívül gazdaságosabban felhasználhatóak. Ezek voltak a neonikotinoidok.

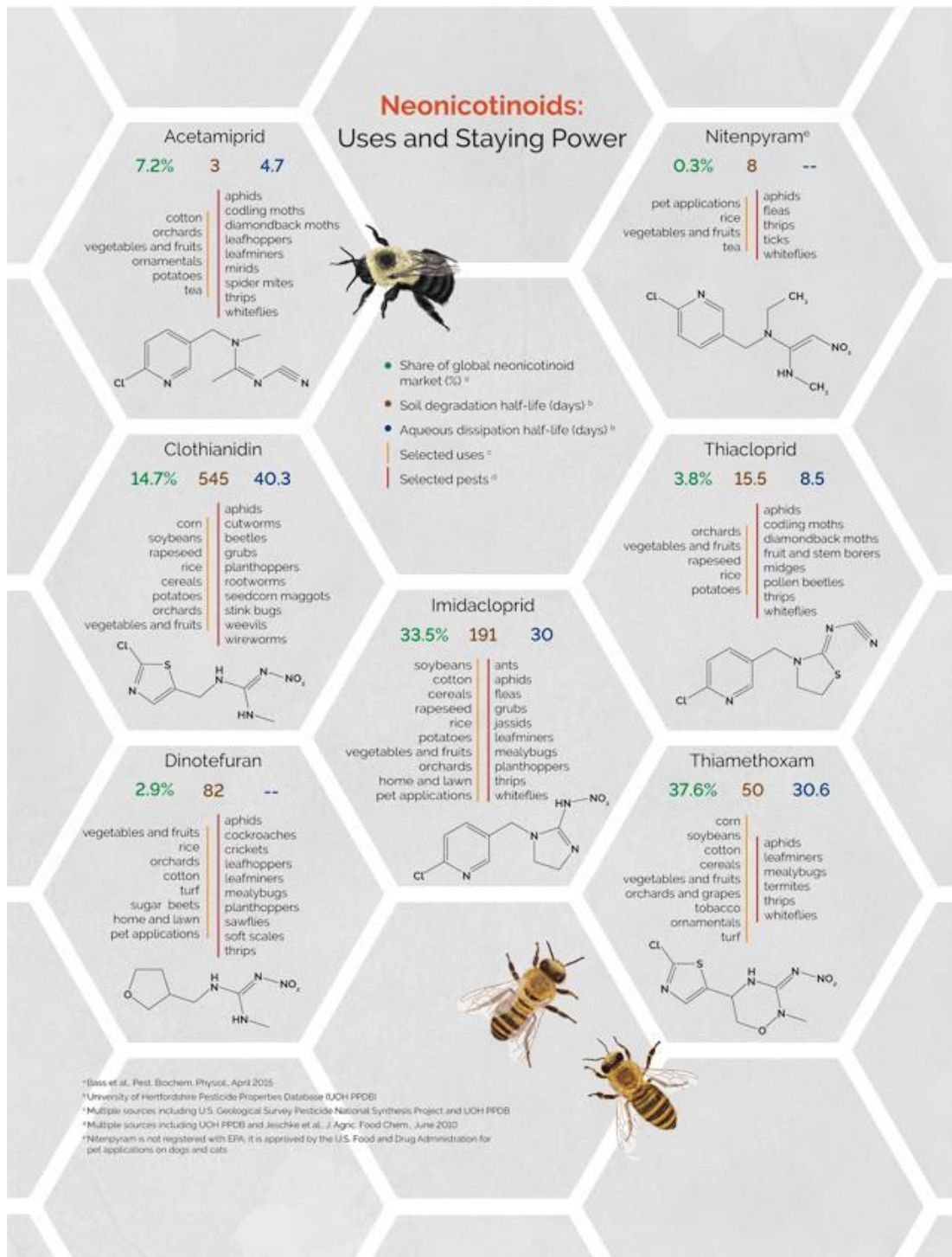
II/2. A neonikotinoidok

A nikotint már az 1600-as években is használták inszekticidként. Azonban, a kezelt gabonanövényekből készült ételek elfogyasztása káros hatásokat, néhány esetben halálozást, váltott ki az embereknél. Növényvédő szerként a környezetben való gyors lebomlása és a hozzászokás miatt növekvő dózisban kellett alkalmazni. A nikotinnal kapcsolatos kutatások részeként [amely több mint 400 éven át a fő rovarirtó szer volt a rovarkártevők elleni

védekezésben (Tomizawa and Casida, 2011)] az 1970-es években a Shell Development Company kaliforniai laboratóriumainak kutatói optimalizálási programot végeztek a nikotin rovarölő tulajdonságain alapuló új termésvédelmi termékekhez. Olyan peszticideket kívántak kifejleszteni, melyek hatásosak (a célszervezetre), viszont az emberi (emlős) szervezetre nem jelentenek szignifikáns veszélyt. Alapvegyületként a nikotin molekula szerkezete alapján szintetizálták az új nikotin-szerű inszekticideket, melyeket neonikotinoidoknak neveztek el. 1977-ben ez a program az *imidacloprid* (IMI) származékának, a nitiazinnak a szabadalmát eredményezte (Tomizawa and Casida, 2005; Kollmeyer és mtsai., 1999). A nitiazin tehát az első szintetizált neonikotinoid vegyület, amelyből az IMI és az összes többi neonikotinoid származik. A nitiazin nem került kereskedelmi forgalomba, mert a fotoinstabilitása miatt nem lehetett forgalmazni a növényvédelemben. Terepi viszonyok között alacsony mértékű perzisztenciával rendelkezett, mérsékelten mérgező volt az emlősökre (Kollmeyer és mtsai., 1999).

Ezen tulajdonságai miatt a nitiazint inkább az állattenyésztésben légyirtóként alkalmazták, ami hiánypótló piacnak számított akkoriban. 1985-ben a Bayer CropScience szabadalmi hullámot indított el a mezőgazdasági vegyipari kutatási ágazatban az IMI-re vonatkozó szabadalmi bejelentések közzétételével. Ezt követően szabadalmaztatták a *thiaclopridot* (TIAK; 1985, Bayer CropScience, Németország), a nitenpirámot (NIP; 1988, Sumitomo Chemical Company, Japán), az acetamipridet (ACT; 1989, Nippon Soda, Japán), a *clothianidint* (KLO; 1989, Sumitomo Chemical Company, Japán), a tiametoxámot (TIAM; 1992, Ciba-Geigy AG, Svájc, valamint a dinotefuránt (DNF; 1994, Mitsui Chemicals Agro Inc., Japán) is (Tomizawa és Casida, 2005). Ezek a szerek az ízeltlábúakra szelektívebb farmakológiai/toxikológiai profilt mutattak, mint a gerinces receptorok esetében. Így már maradéktalanul megfeleltek azon feltételeknek, amelyeknek az addig forgalomba hozott peszticidek nem tudtak. Emiatt rövid időn belül nagyon népszerűek lettek. Az első valóban

sikeres neonikotinoid inszekticid az IMI volt, amelynek piaci megjelenésére 1991-ben került sor. Ezt követően a NIP 1995-ben, az ACT 1996-ban, a TIAM 1997-ben, a TIAK 1999-ben, a KLO pedig 2002-ben került a boltok polcaira, mint rovarölőszer-hatóanyag (Reynard, 2012; Wood and Goulson, 2017a; Mörtl és mtsai., 2020; Thompson és mtsai., 2020;). Az IMI megjelenésével a rovarirtó piacon a gazdák - rizs, kukorica és más alapvető élelmiszertermelők, gyümölcs- és zöldségtermelők - egyfajta úgymond „forradalmi innovációra” tehetek szert a termést károsító rovarokkal szemben.



1. ábra: A neonicotinoid hatóanyagok globális kereskedelmi részaránya (zöld számok) a vizes közegben bekövetkező disszipáció (piros számok), a talajban végbemenő degradációs felezési idő (kék számok), valamint a jellemző kezelt és kártevő fajok listája (Oleson, 2017).

Az 1. ábrán lévő adatok szerint is az IMI, a TIAM (bomlástermék: KLO) és a KLO a három legnépszerűbb neonikotinoid 2017-ben, ami ökotoxikológiai szempontból problémás, hiszen ezen három anyag rendelkezik a leghosszabb természetben történő lebomlási idővel (KLO felezési ideje 545 nap talajban, 40,3 nap vizes közegben; IMI felezési ideje 191 nap talajban, 30 nap vizes közegben; TIAM felezési ideje 50 nap talajban, 30,6 nap vizes közegben) (Oleson, 2017).

II/3. A neonikotinoidok nevezéktana

A neonikotinoid kifejezést az IMI-re és a hozzá szerkezetileg és funkcionálisan hasonló, a nikotin vegyületből kifejlesztett inszekticid vegyületekre használják. Szerkezetük és hatásmechanizmusuk hasonló az (S)-nikotinhoz, amely egy alkaloid inszekticid.

Az alkaloidok az élővilágban elterjedt, nitrogéntartalmú, másodlagos anyagcseretermékek, karakteres farmakológiai, mérgező hatást mutatnak. A ma ismert több, mint tízezer alkaloid döntő többsége növényekben fordul elő, de megtalálhatók baktériumokban, gombákban, vagy ritkábban állatokban is (Doolittle et al., 1995). A neonikotinoidok szerkezet és kronológia szerinti csoportosítását az 1. táblázat mutatja be.

SZERKEZET (Jeschke és mtsai, 2011)	KRONOLÓGIA (Reynard, 2012); (Qi és mtsai, 2018); (Shao Liu és mtsai, 2013)			
nitroguanidinek nitrometilén cianoamidinek	első generáció (kloronikotinil csoport)	második generáció (tianikotinil csoport):	harmadik generáció (furanikotinil):	negyedik generáció
gyűrűs	IMI	<i>KLO</i>	<i>DNF</i>	imidaklothiz
<i>aciklikus</i>	TIAM	TIAM		paichongding
	<i>NIP</i>			cikloxaprid
	<i>ACT</i>			guadipir
				huanyanglin

1. táblázat: A neonikotinoidok csoportosítása

II/4. A neonikotinoidok hatásmechanizmusa, valamint fizikai- és kémiai tulajdonságai

A neonikotinoidok az acetilkolin (ACh), a központi idegrendszer egyik fő serkentő neurotranszmitterének hatását utánozzák. Elsődleges hatásmechanizmusuk a rovarok agyának poszt-szinaptikus nikotinos ACh receptoraihoz (nAChR) való erős kötődés (Buckingham és mtsai., 1997; Matsuda és mtsai., 2001, 2005; Crossthwaite és mtsai., 2017), majd nAChR-agonistaként a rovarok idegrendszerének folyamatos ingerlése (Zhang és mtsai., 2000; Matsuda és mtsai., 2001; Tomizawa and Casida, 2003; Tomizawa and Casida, 2005; Tufi és mtsai., 2015; Vehovszky és mtsai., 2015; Fodor és mtsai., 2020). Ezt bizonyítja pl: hogy a puhatestűek jobb oldali lábducának dorzális óriásneuronjában (RPeD1) az ACh által kiváltott membránválaszokat a neonikotinoidok gátolják (Vehovszky et al., 2015). Ezen folyamatok eredményeképpen neurális túlingerlés (depolarizáció) alakul ki az idegsejtekben, ami az exponált célszervezet rövid időn belül bekövetkező halálához vezet (Tomizawa and Casida, 2005; Belzunces és mtsai., 2012). A fő különbség a neonikotinoidok és más peszticidok toxikológiai profilja között, hogy a hatások idővel halmozódnak, mivel az idegsejtek nem regenerálódnak. Ezt idő-kumulatív toxicitásnak nevezzük (Tennekes and Sánchez-Bayo, 2013). Az organofoszfátok, vagy a piretroidok hatása átmeneti és visszafordítható, amint a célreceptorok, vagy enzimek regenerálódnak (Matsumura, 1985).

Ezeknek a szerves inszekticideknek közös jellemzője, hogy legalább egy (piridin, vagy imidazolidin) gyűrűt tartalmaznak, vannak köztük a gyűrűn kívüli aciklikus funkcióscsoportokat (nitrometilén, nitroimin, cianoimin, cianometilén, dicianometilén, karbonil) tartalmazó vegyületek is (Nauen et al., 2001). A neonikotinoidok gyűrűszerkezete különböző szegmensekből áll, amelyek áthidaló fragmentumokat, heterociklusos csoportot és funkcióscsoportokat tartalmaznak.

csoportokat tartalmaznak. A metilén-csoportnak általában áthidaló szerepe van. Vizsgálatok bizonyítják, hogy a metilén- vagy etilén-szubsztituens csökkenti a biológiai aktivitást (Tomizawa and Yamamoto, 1993; Tomizawa and Casida, 2003).

Az elektrondús nitrometilén, nitroimin, cianoimin csoport a szelektivitás kulcsa, azaz, hogy a rovarok idegrendszerében jelen lévő nAChR-hez erősebben kötődnek, mint a gerincesek hasonló receptoraihoz, ez hozzájárul a kedvezőbb toxikológiai profilhoz (Kimura-Kuroda és mtsai., 2012; Casida and Durkin, 2013; (Houchat és mtsai., 2020). Ez a szelektivitás a becslések szerint 5-10-szer erősebb, mint a korábban térhódító organofoszfát, metilkarbamát növényvédő szerek esetében (Tomizawa and Casida, 2005; Thompson és mtsai., 2020).

Az nAChR-ek a ligandum-kapu ioncsatornák cisz-hurok szuperfamilájába tartoznak (Beck et al., 2015). Funkciójuk a gyors kolinerg ingerületvezetés a gerinces és gerinctelen szervezetekben egyaránt (Terali, 2018). Az nAChR-ek szerkezetileg transzmembrán doménegységek, extracelluláris N-terminális és központi kationcsatornát tartalmaznak (Wu et al., 2015). A ligandumok és az nAChR altípusok szerkezetétől függően a neonikotinoidok által kifejtett hatásoknak széles spektruma van az agonista hatás erősségét illetően. A neonikotinoidok tartalmaznak imidazolidin, tiazolidin, guanidin protonmentes csoportokat. Az elektronegatív nitro- vagy ciano csoportok befolyásolják a molekula hatáserősségét és szelektivitását azáltal, hogy ezek a farmakoforok erős kationos kötést hoznak létre a rovarok idegrendszerében lévő nAChR-kal. A protonált nikotinoidok kation-pí kölcsönhatást hoznak létre a gerinces nAChR-rel. A neonikotinoidok elektronegatív toxikoforja és a nikotinoidok kationos toxikoforja (nikotin, deznitro-IMI) az oka annak, hogy a kötőhelyeken ellentétes irányban kötődnek (Tomizawa and Casida, 2003, 2009). A gerinces neurotranszmitter ioncsatornában lévő agonista ligandumok pozitív töltésűek. A kationos iminium csoportok, (mint ami pl a deznitro-IMI-ben is megtalálhatóak) kapcsolódnak a π -nukleofil aromás struktúrákhoz, amelyek magukban foglalnak triptofánt az α 4-alegység β 2-hurokból. A D-

hurokban lévő Gln55 megőrződik a rovar nAChR-ek nem- α alegységeiben, mint aminosav származék. A TIAM neonikotinoid-ban lévő cianocsoport, valamint az IMI és a KLO nitrocsoportjainak kölcsönhatásai szemléltetik a D-hurok funkcionális különbségeit, amik meghatározzák a neonikotinoidok hatását a rovar nAChR-ben (Ihara et al., 2014). Továbbá, az IMI nitro csoportja kettős kötést alakít ki a G-hurokban a Lys34-gyel és az Arg55-tel a D-hurokban. Ezek az aminosav-származékok szintén fontos szerepet játszanak a neonikotinoidok rovar nAChR-szelektivitásában (Shimomura et al., 2006). Az IMI erős affinitását a nem célszervezetek nAChR-hez kimutatták pl. a cseresznye garnéla (*Neocaridina denticulata sinensis*; Wilhem de Haan, 1844) esetében is (Siregar et al., 2021). A nagy mocsáricsigán (*Lymnaea stagnalis*; Linnaeus, 1758) végzett kísérletek feltárták, hogy az IMI kötési energiája a nAChR-hez $-6,0$ kcal/mol, szemben az ACh $-4,2$ kcal/mol értékével. A viszonylag erős kötést az IMI piridin csoportjában a nitrogénatom hidrogénkötése biztosítja a Trp143-mal és az amidin N-nitro Tyr192 fenolszármazékával (Malhotra és mtsai., 2021; Ihara és mtsai., 2014).

Ezzel ellentétben az ACh csak gyenge van der Waals kötést létesít a Trp143-mal a nAChR-on (Siregar et al., 2021). A TIAM a rovarok nAChR-nek gyenge agonistája (Nauen et al., 2003); Tan és mtsai., 2007; Benzidane és mtsai., 2010). Ugyanakkor erős agonista hatást fejt ki az interneuron szinapszisokban, ahol depolarizációt indukál, amelyet a muszkarin antagonistá atropin részben csökkent. Ez arra utal, hogy a TIAM képes kötődni a nikotin és a muszkarin receptorokhoz is (Lapied és mtsai., 1990; Thany, 2011). A DNF és a KLO kemostimuláló hatása alacsonyabb, mint az IMI esetében. A DNF és az IMI blokkoló hatása erősebb, mint a KLO-nál tapasztalt (Kiryama and Nishimura, 2002). A DNF és származékainak rovarölő aktivitása inkább blokkoló hatásból ered, mintsem stimulációból. Ez megfigyelhető más neonikotinoidoknál is (Kagabu et al., 2008).

Metabolizmusuk két fázisra osztható: Az első fázisban a citokróm-P450 enzimes család vesz részt. Az imidazolidin és tiazolidin demetiláció, nitroredukció, cianohidrolízis és hidroxiláció folyamatok révén olefinképződés mellett. Az oxadiazin hidroxilációja gyűrűnyílással, valamint kloropiridinil és klorotiazolil diklórozással jár együtt (Ford and Casida, 2008; Casida, 2011). Néhány neonikotinoid esetében citoszolos aldehid-oxidáz a citokróm-P450-nel együtt felel a nitrocsoport redukciójáért az emlősökben (Dick és mtsai., 2005; Casida, 2011). Elsőfázisú metabolitok megtalálhatók kisemlősökben és növényekben egyaránt (Chen és mtsai., 2005; Casida, 2011). A második fázisú metabolizmus során konjugátumképzés zajlik, mely különböző úton megy végbe emlősök és növények esetében (Ford and Casida, 2008; Casida, 2011). Ebben a fázisban néhány vegyületspecifikus metabolit kivételével az összes bomlástermék jellemző valamennyi neonikotinoid-ra (Schulz-Jander and Casida, 2002; Ford and Casida 2006, 2008; Shi és mtsai., 2009; Casida 2011). Az intenzív metabolizmusnak köszönhetően a neonikotinoidok hosszan tartó hatása biztosított a kártevők ellen egészen a kezelt növény elfogyasztásáig (Nauen et al., 1998).

A neonikotinoidok nagyon jól oldódnak vízben, pH 5 - 7 között stabilnak tekinthető (a bomlási ráta nem szignifikáns) különösen anaerob közegekben (Goulson, 2013; Anderson és mtsai., 2015; Bonmatin és mtsai., 2015). Ennél savasabb, vagy lúgosabb pH-n bomlásuk viszonylag gyorsan végbemegy. Példaként a TIAM felezési ideje az ideális kémhatástartományban több, mint egy év, pH 9 esetén csak néhány nap (Clough, 2014). Kimutatták, hogy a nitro-metilén funkciós csoport jó fényabszorbens az UV-B, UV-A sugárzás 290-400 nm hullámhosszán, ezért a KLO, TIAM, NIP neonikotinoidok UV-fényérzékenyek, napsugárzás hatására gyorsan bomlanak. Az IMI-ben lévő nitro-, valamint az ACT-ben található ciano-csoport miatt ezek a vegyületek nem fotoérzékenyek (Seifert, 2014).

Összegezve tehát, habár a kiindulási molekulák bizonyos körülmények között (pl. UV-sugárzásnak kitéve, optimális pH tartományon kívül) viszonylag gyorsan bomlanak, védett körülmények között (pl. a talajban, vízi üledékben) a vegyületek perzisztenciát mutatnak (2. és 3. táblázat).

Hatóanyag	CAS-szám	Képlet	Molekul a-tömeg	Vízoldhatóság (mg/L)	Megoszlási hányados (log K _{ow})	Felezési idő (nap)			
						Fotolízis	Hidrolízis	Üledék	Talaj
ACT	135410-20-7	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222,7	2950	0,8	34	420	4,7	4-7
KLO	210880-92-5	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	249,7	340	0,9	0,1	14	40-56	13-1386
IMI	138261-41-3	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255,7	610	0,57	0,2	365	30-129	104-228
TIAK	111988-49-9	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252,7	184	1,26	Stabil (pH: 4-7)		8-28	9-27
TIAM	153719-23-4	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291,7	4100	-0,13	2,7	12	31-40	7-72

2. táblázat: A neonikotinoidok fő fizikai-kémiai tulajdonságainak összefoglalása (Sánchez-Bayo and Hyne, 2014)

Hatóanyag	Tavaszi	Nyár	Ősz	Tél
TIAM	0,32	0,2	0,63	1,49
KLO	0,53	0,35	1,23	3,31
IMI	0,36	0,24	0,83	2,22
ACT	16,5	9,67	29,7	67,9
TIAK	14,3	8,75	26,6	60,3

3. táblázat: Neonikotinoid hatóanyagok becsült felezési ideje (nap) az 50. szélességi fokon fekvő felszíni vizekben (Lu és mtsai., 2015)

II/5. A neonikotinoidok használatának előnyei

A neonikotinoidok kifejlesztői meg voltak győződve arról, hogy ezek a vegyipari innovatív termékek elsősorban a kártevőkre hatnak és nincsenek hatással emlősökre, madarakra, halakra, talajlakó férgekre és azokra a rovarokra, amelyek hasznosak lehetnek az ökoszisztéma szempontjából. Az IMI kisebb dózisban és könnyebben (volt) alkalmazható,

mint a bevezetése előtt használt népszerű rovarölő szerek [DDT az 1940-es, organofoszfátok az 1950-es, metilkarbamátok az 1960-as, piretroidok az 1970-es évektől (Casida and Durkin, 2013)], hiszen többféleképpen kijuttatható a művelési területre, a csávázási technika elterjedésével a hatóanyag már nem távozik el a növény felületéről, hanem felszívódik a növényi szövetekbe ezzel növelve a hatékonyságot, csökkentve a felhasznált mennyiséget és a környezeti terhelést. Ezért is lettek ezek a neuroaktív anyagok közé tartozó, kémiaiag nikotinnal rokon szintetikus rovarölő szerek világszerte széles körben elterjedtek (Matsuda és mtsai., 2001).

A neonikotinoidok felhasználása négy fő területet fed le (Barbee and Stout, 2009); (Chagnon és mtsai., 2014):

- termények és dísznövények védelme (rovarok, atkák);
- városi kártevők elleni védekezés (csótányok, hangyák, termeszek, darazsak, legyek)
- állatorvosi alkalmazások (bolhák, kullancsok);
- akvakultúrában történő alkalmazásuk [pl. a rizs zsizsik (*Lissorhoptrus oryzophilus*; Kuscel, 1951) ellen, amely a kaliforniai vörösrák (*Procambarus clarkii*; Girard, 1852) élősködője]

A neonikotinoidok sokféleképpen alkalmazhatók a mezőgazdaságban, a kertészetekben, faiskolákban és az erdőgazdálkodásban: permetezés, vetőmag csávázás, vetőmag-permetezés, talajkezelés, szemcsés kijuttatás, palánták áztatása, talajáztatás, barázdázás, törzsinjektálás. A vetőmag és a talajkezelések kb. 60%-át teszik ki a teljes felhasználásnak világszerte (Jeschke et al., 2011). Az Európában engedélyezett szántóföldi felhasználások körülbelül 70%-a permetezés volt 2012-ben, míg kevesebb mint 20%-a vetőmag kezelés és kevesebb mint 20 %-a más alkalmazási mód (csepegtető öntözés, talajkezelés) volt. Szintén Európában ekkor

több, mint 200 féle növényvédő szer hatóanyaga volt az IMI, a TIAM, a KLO, az ACT, a TIAK. A termények széles skáláján alkalmazták őket. Ilyen például a burgonya, rizs, kukorica, cukorrépa, gabonafélék, repce, napraforgó, szója, gyümölcsök, zöldségek és dísznövények (EFSA, 2013).

Osztály	Szisztemikus hatás	Idegrendszeri támadáspont	LD50 (mg/kg)		Szelektivitási faktor
			Rovarok	Patkányok	
Neonikotinoidok	+	nAChR	2	912	456
Organofoszfátok	±	AChE	2	67	33
Metilkarbamátok	±	AChE	2,8	45	16
Organoklorinok	-	Na ⁺ és Cl ⁻ csatornák	2,6	230	91
Piretroidok	-	Na ⁺ csatorna	0,45	2000	4500

4. táblázat: A neonikotinoidok összehasonlítása más inszekticid osztályokkal (Tomizawa and Casida, 2005)

A 4. táblázat adataiból kitűnik, hogy miért lehet létjogosultsága a neonikotinoidok használatának más korábbi hatóanyagokkal szemben. Az LD₅₀ és a szelektivitási faktorok adatai alapján látható, hogy nagymértékű szelektivitással rendelkeznek, így a gerinctelen szervezet(ek)re fokozottabb hatást gyakorolnak, mint a gerinces organizmus(ok)ra. A piretroidok hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban korántsem olyan hatékonysággal alkalmazhatóak, mint a neonikotinoidok. Ennek háttérében hatásmechanizmusbeli különbségek állnak.

Összetevők	IC ₅₀ (µM/l)		Szelektívítási hányados
	Rovar	Gerinces α4 β2	
Neonikotinoidok			
ACT	8,3	700	84
KLO	2,2	3500	1591
DNF	900	> 100000	> 111
IMI	4,6	2600	565
NIP	14	49000	3500
TIAK	2,7	860	319
TIAM	5000	> 100000	> 20
Nítiazin	4800	26000	5,4
Nikotinoidok			
Deznitro-IMI	1530	8,2	0,005
Dezciano-TIAK	200	4,4	0,022
Nikotin	4000	7	0,002
Epibatidin	430	0,04	0,0001

5. táblázat: A neonikotinoidok és a nikotinoidok közti fő különbség, amiért szükség volt a nikotinoidok továbbfejlesztésére (Tomizawa and Casida, 2005)

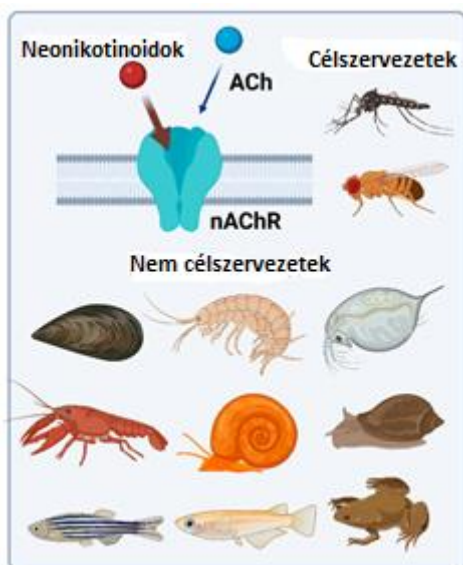
Az 5. táblázatban látható, hogy a nikotinoidok szelektivitása igen alacsony, tehát nem hatnak specifikusan egy adott élőlénycsoportra, hanem valamennyi kontaminált szervezeten kifejtik (toxikus) hatásaikat. Mindemellett a gerinces organizmusokra lényegesen nagyobb hatást fejtenek ki (IC₅₀ alapján), mint a gerinctelenekre, melyek közé a célszervezetek tartoznak. A neonikotinoidok hozták meg e tekintetben a nagy áttörést.

II/6. A neonikotinoidok hátrányai

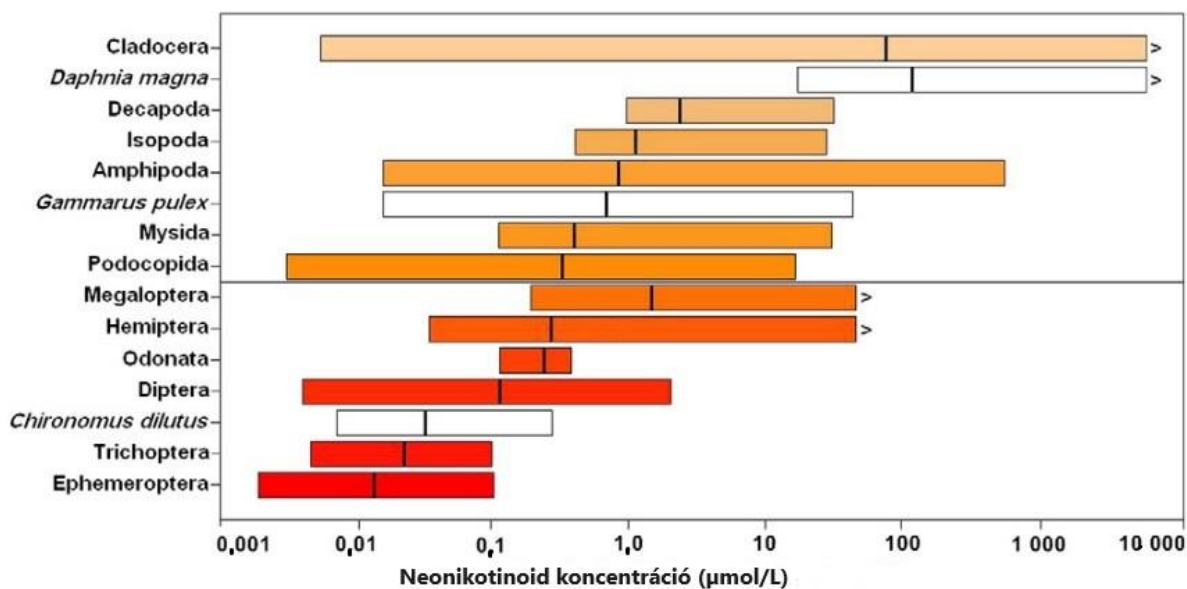
A kiemelkedő mennyiségű neonikotinoid használat jelentős kémiai nyomást gyakorol a környezetre, különösen azért, mert ezek a vegyületek nagyfokú környezeti perzisztenciát mutatnak, ahogy azt a 2/4-es fejezetben összefoglaltam (Goulson, 2013).

2006-tól számítható a neonikotinoidokhoz fűződő azon bizalmatlanság, miszerint korántsem olyan ártalmatlanok a nem célszervezetként számontartott gerinctelen fajokra nézve, mint azt kezdetben gondolták. Kiderült, hogy a méhkolóniák globális kihalása kapcsolatba hozható az új típusú vegyszerek térnyerésével. A neonikotinoid toxicitás vizsgálatok kezdetén főként vízibolhákra, közönséges zooplankton rákfélékre és egyéb gerinctelen tesztfajokra koncentráltak [pl: vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*; Pallas, 1771)]. A vizsgálatokból kiderült, hogy a *D. magna* nagyon alacsony érzékenységet mutat az IMI-re, a hatás csak a sokszoros javasolt (művelési területre kijuttatandó) dózisonál értékelhető, ugyanakkor más rákfélék a vízibolhánál sokkal érzékenyebben reagáltak (2. ábra). A 48-órás akut expozícióban a *D. magna* IMI-re vonatkoztatott LC₅₀ dózisa (10 - 85 mg/L) több nagyságrenddel nagyobb, mint piretroidok, organofoszfátok, vagy karbamátok esetén (Song és mtsai., 1997). A négynapos LC₅₀ tesztek szerint a szokásos halfajok, mint modellszervezetek [szivárványos pisztráng (*Onchorhynchus mykiss*) 83–281 mg/L, zebradánió (*Danio rerio*)] még kevésbé érzékenyek az IMI-re (Ding és mtsai., 2004; Sánchez-Bayo és mtsai., 2016a).

Két vízibolha faj a *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1894) és a *D. magna* IMI-vizsgálatából arra derült fény, hogy a *Ceriodaphnia dubia* 7 napos kezelés során a letalitási végpont tekintetében négyszer, a szaporodás vonatkozásában másfélszer érzékenyebb a *D. magna*-nál, pedig ez utóbbi 21 napig volt kitéve a szerhatásnak (Raby, és mtsai., 2018b).



2. ábra: Az *in vivo* toxicitástesztek legjelentősebb, célzott és nem célszervezetnek számító gerinctelen és gerinces modell és tesztszervezetei (Malhotra et al., 2021).



3. ábra: Neonikotinoidok akut 24–96-órás LC₅₀ toxicitása vízi gerinctelen tesztszervezetreken. Fehér színnel a három legnépszerűbb modell (és teszt) szervezet: *Daphnia magna* (Straus, 1820), *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758), *Chironomus dilutus* (Meigen, 1803). A sávokon belüli függőleges vonalak a teszteredmények geometriai átlagát jelzik.

Számos kutatás megerősíti azt a hipotézist, miszerint a hatóanyagok önmagukban, lebomlási termékeikkel keveredve, illetve a lebomlási termékek formájában egyaránt jelentős környezeti kockázatot jelentenek, és a neonikotinoidok ökotoxikológiai hatásvizsgálatai során a jelenleg alkalmazott modellállatoknál érzékenyebb hatásviselő fajok alkalmazása szükséges a realisztikus hatások feltérképezéséhez (A vonatkozó adatokat a Függelék című fejezet tartalmazza: 21-31. táblázat).

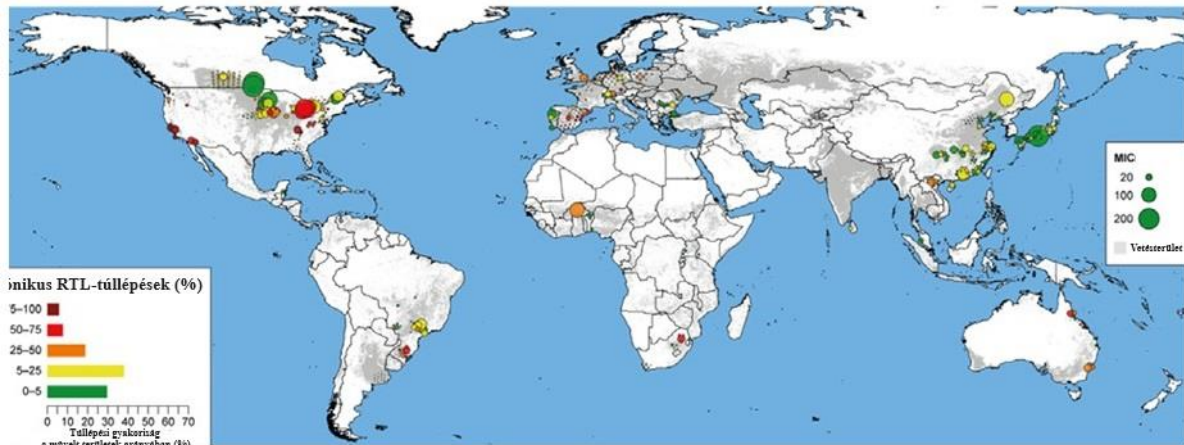
II/6/1. A neonikotinoidok környezeti előfordulása és toxicitása

Az alábbiakban a neonikotinoidok környezeti koncentrációjával kapcsolatos vizsgálatok eredményeit foglalom össze röviden. A teljesség igényére való törekvéssel összeállított, részletes táblázatokat a Függelék című fejezet tartalmazza.

A Föld különböző tájain, különféle közegekben több éves ciklusokban detektált mérési eredmények arról tanúskodnak, hogy bolygónk neonikotinoid terheltsége napjainkban igen jelentős.

Neonikotinoid rovarölőszerek Mezőgazdasági felhasználás > 120 országban

globálisan 3983 felszíni vízben kimutatva



4. ábra: A neonikotinoidok globális előfordulása a felszíni vizekben a koncentráció-határértékek tükrében (Stehle et al., 2023)

A 4. ábra arról szolgáltat információt, hogy a neonikotinoidokat több, mint 120 országban alkalmazták a preventív agrárkultúrába integrálva. Globális viszonylatban közel 4000 felszíni víztestből vett minták alapján összeállítottak egy térképet, mely a szabályozási határérték felett kijuttatott mennyiségeket mutatja területi eloszlásban, a határérték %-os arányában kifejezve. Látható, hogy Észak-Amerika és Nyugat-Európa a leginkább érintett.

Földrajzi hely	Vizsgált időszak	Neonikotinoid	Neonik. átlag konc. (ng/l)	Neonik. max. konc. (ng/l)	Detektálási ráta (%)	Referencia	
St. Lawrence folyó, Kanada	2017	TIAM	4	1 - 42		Montiel-León és mtsai, 2019	
		KLO		1 - 70			
		IMI		1,2 - 11			
Ontario, Kanada	2012 - 2014	IMI	0,002	10400	> 90	Struger és mtsai, 2017; Wood és Goulson, 2017	
		KLO		0,043	> 80		
		TIAM		0,017	> 80		
Vörös folyó, Kanada		TIAM	8	14,1–31,7		Challis és mtsai, 2018	
KLO							
IMI							
Iowa (egyetem)		KLO	57			Klarich és mtsai, 2017	
		IMI					
		TIAM					
Jangce folyó, Kína	2015	ACT	2,5		64–100	Mahai és mtsai, 2019	
		IMI	4,37				44,4
		TIAM	1,1				236
		NIP	0,34				
		KLO	0,1				
		TIAK	0,02				
Ausztrália		IMI		4560		Sousa és mtsai, 2018	
		TIAK		1370			
Rio Grande do Sul, Brazília				1660			
Spanyolország		IMI		656			
Pinios folyó, Görögország		TIAM		330			
		IMI		306			
		TIAK		120			
Ave folyó, Portugália		IMI		480		Sousa és mtsai, 2019	
		TIAM		215			
		KLO		51,7			
Sousa folyó, Portugália		IMI		208 - 213			
		TIAM		4,7 - 17,8			
Iowa, USA (mezőgazdasági területek, 9 folyó)	2013			0,5	76 (1 neonik) 50 (>2 neonik)	Hladik és mtsai, 2014	
25 USA állam + Puerto Rico (48 folyó, mezőgazdasági vagy városi területek)	2012 ősz - 2014 nyár			0,45	63 (>1 neonik) 26 (>2 neonik)	Hladik és Kolpin, 2016	

Appalache-hegység, USA			67	379		Benton és mtsai (2016)
Szennyvíztisztító telepek, Peking, Kína		IMI	45 - 100 (bemenő) 45 - 106 (kimenő)			Qi és mtsai (2015) és Sadaria és mtsai (2016)
Hollandia				320000		van Dijk és mtsai 2013
Texas, USA		TIAM, ACT		225000		Anderson és mtsai 2013
Kalifornia, USA			50 - 3290		89	Starner és Goh, 2012
New Brunswick; Prince Edward Island, Kanada		IMI		420 - 15880		Xing és mtsai, 2013
Kanada, wetland-ek	2012 nyár		91,7	3110		Xing és mtsai, 2013
Sydney, Ausztrália, kertészeti és zöldségtermesztő régiók folyói		IMI		4600	27 - 93	Sanchez- Bayo és Hyne, 2014
		TIAM		1400		
Kalifornia, USA		IMI		3290	89	Starner and Goh, 2012). Main és mtsai (2014)
Kanada, füves puszták		KLO		3100		Morrissey és mtsai, 2015)
		TIAM		1500		
Quebec, Kanada		KLO		55700		
		TIAM		63400		

6. táblázat: Szemléletes példák a felszíni vízminták neonikotinoid-tartalmára.

	Hatóanyag	Hely	Detektálási ráta (%)	Időszak (év)	Átlag koncentráció-tartomány (ng/L)	Maximum koncentráció (µg/L)	Referencia
felszíni vizekből	IMI	Sacramento és Orange megye	50	2010 - 2011	40 - 50	0,7	Ensminger és mtsai, 2013 Stamer és Goh, 2012
			89 (19% meghaladja az IMI USEPA ref. értékét (1,05 µg/L))			1,38 - 3,29	Stamer és Goh, 2012
		Kisco folyó	40			0,13	USGS (2002) Phillips and Bode, 2004
	KLO	Osaka, Japán	91	2009 - 2010	3,2		Yamamoto és mtsai, 2012
	IMI, TIAM		80; 87		5,5; 2,6		
	KLO, IMI, TIAM	Sydney, Ausztrália				0,42; 4,56; 1,37	(Sánchez-Bayo and Hynes, 2014).
	IMI	Hollandia				200000	van Dijk, 2010
		Svédország				15000	Kreuger és mtsai, 2010
		Brazília				2600	Stamer and Goh, 2012
		Vietnám				220	Lamers és mtsai, 2011
		Kanada				4,7	American Bird Conservancy, 2013
	KLO, IMI, TIAM	Kanada, szőlőtermelő vidékek		2011	35; 27; 170		
			Kanada, gabonatermő területek (árpa, zab, repce)			3,11; 0,256; 1,49	
talajvízből	IMI	Quebec, Kanada, burgonyatermő régiók	61	2008 - 2009		6,1	Quebec Kormánya, 2011
	TIAM, KLO		8; 4	1999 - 2001		0,83; 0,059	
	KLO	Illinois, USA kukoricatermő régiók				0,06	de Perre és mtsai (2015)

7. táblázat: Neonikotinoidok detektált koncentrációja víztestekben, különböző földrajzi helyeken (Anderson et al., 2015)

Hely	Időszak	Neonik	Koncentráció (ng/L)	Referencia
kukorica, napraforgó földeken fekvő víztestek	2017, tavasz-nyár	TIAM	4 - 30	Székács és mtsai 2015
		KLO	17 - 40	
10000 - 41000				
Duna folyó, Budapest		TIAM	4,65 - 16,83	
	KLO	3,54 - 11,43		

8. táblázat: Magyarországi példák Neonikotinoid környezeti koncentrációkra (Székács et al., 2015)

A 2000-es évek eleje óta több tanulmány is aggodalmát fejezte ki azzal kapcsolatban, hogy a mezőgazdaságban legszélesebb körben használt három neonikotinoid – a KLO, az IMI és a TIAM - negatív hatással vannak a nem célzott szervezetekre is, melyek közül elsőként a szárazföldi rovargyűtésekre irányult a figyelem (Henry et al., 2012); (Whitehorn et al., 2012). Elterjedt az a hipotézis, miszerint ezek a vegyi anyagok a fajok szélesebb körére veszélyesebbek, mint azt kifejlesztésükkor, illetve forgalomba hozataluk idején gondolták. Az utóbbi évtizedben számos tanulmány számolt be a neonikotinoidok káros hatásairól különböző fajokat, az embert és környezetét illetően (Desneux és mtsai., 2007; Sánchez-Bayo és mtsai., 2016; Cimino és mtsai., 2017; Bonmatin és mtsai., 2019; Richardson és mtsai., 2019; Borsuah és mtsai., 2020; Pagano és mtsai., 2020). Bár a KLO, az IMI és a TIAM szántóföldi használatát az Európai Unió már 2018-ban betiltotta, a világ más részein napjainkban is alkalmazzák a növényvédelemben. Így jellemzően globálisan kimutathatóak felszíni vizekben literenként néhány ng – néhány µg koncentrációban (Mörthl és mtsai., 2020), ahogy azt a 6-8. táblázatok is szemléltetik.

A perzisztencia, a vízben való oldhatóság és a mobilitás miatt a TIAM-ot gyakran kimutatják folyókban és tavakban, ami potenciális kockázatot jelent a vízi szervezetekre.

A felszíni vizekben világszerte 0,02 és 4,50 µg/L közötti koncentrációban regisztrálták a TIAM-ot (Süss, Bischoff, Mueller, 2006 ; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014). A legmagasabb koncentrációt (4,50 µg/L) a Hamburg melletti Elba folyóba ömlő csatornák felszíni vizében mérték (Süss, Bischoff, Mueller, 2006).

Az ausztráliai Sydney-ben 1,4 µg/L TIAM-ot mutattak ki esőzések után a kertészeti és zöldségtermesztési területekről lefolyó folyókban (Sánchez-Bayo and Hyne, 2014b) .

Felszíni vizekből kimutatott legmagasabb neonikotinoid koncentrációk:

IMI: holland mezőgazdasági területeken, 320 µg/L (Van Dijk és mtsai., 2013)

TIAM és ACT: texasi fennsíkok vizes élőhelyein, 225 µg/L (Anderson és mtsai., 2013).

Neonikotinoidokat talajvízben 1,93 µg/L (IMI) és 8,93 µg/L (TIAM) közötti maximális koncentrációban mutattak ki (Huseth és Groves, 2014 ; Morrissey és mtsai., 2015).

Napjainkra világszerte számos bizonyíték lelhető fel a tekintetben, hogy ezek a nagy mennyiségben felhasznált szerek potenciális kockázatot jelentenek a vadméhekre, háziméhekre, a vízi gerinctelenekre és gerincesekre, valamint az emberre nézve is, mivel a vegyületek könnyen kimosódnak a talajból a felszíni vizekbe (de Oliveira és mtsai., 2010; Grimm és mtsai., 2012; Starner and Goh, 2012; Rundlöf és mtsai., 2015; Vogel, 2017; Wood and Goulson, 2017; Sumon és mtsai., 2018; Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Mörtl és mtsai., 2020; Bonmatin és mtsai., 2021).

Az egyik környezettoxikológiai vizsgálat sorozat alkalmával (Sanchez-Bayo and Goka, 2006) létrehoztak egy kísérleti rizsföldet és a palánták egy részét a gyártó által ajánlott módon IMI-dal kezelték, néhányat pedig kontroll növényként használtak. Több mint négy hónap elteltével arra jutottak, hogy a kártevő rizs zsizsikék mellett a rizsföldet elárasztó vizekben élő rákfélék és rágcsálók populációi is csökkentek a kontroll területhez képest. A nem célszervezetek számának csökkenése az első hónapban volt megfigyelhető leginkább, amikor az IMI koncentrációja még 240 µg/l volt. A talajba szivárgás miatt a vizsgálati időszak végére ez 1 µg/L-re csökkent a rizsföldek vizében, ami lényegesen alacsonyabb volt, mint ami a *D. magna* pusztulását okozta.

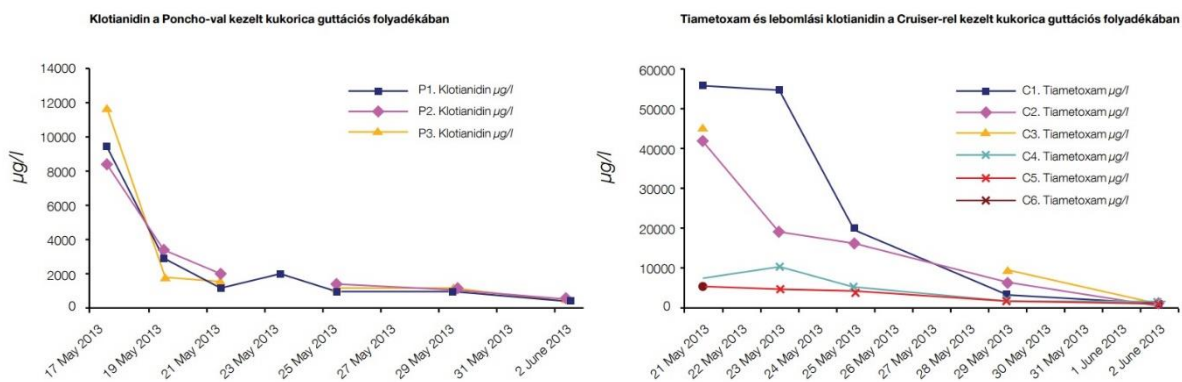
2015-ben Christy Morrissey (Saskatchewan University, Kanada), valamint Sánchez-Bayo 214 korábbi toxicitási vizsgálat eredményeit vizsgálta, amelyeket 49 különböző vízi rákfajra és rovarfajra végeztek el. Arra a következtetésre jutottak, hogy már 1 µg/L, vagy ennél kisebb koncentrációjú akut neonikotinoid kontamináció is káros hatást gyakorolhat a vízi szervezetekre. Tehát a hosszú távú kitettségnek még alacsony szermaradvány koncentráció esetében is lehetnek negatív fiziológiai, vagy viselkedésbeli változásokat előidéző hatásai (Morrissey et al., 2015b). Ha a minták legalább 20%-ában a meghatározott 1,05 µ/L határérték

feletti koncentrációban fordulnak elő a neonikotinoidok, az jelentős veszélyt jelent a vízi gerinctelenekre (Wood and Goulson, 2017).

Az iowai és a Chesapeake-öbölbeli vízgyűjtő területeken lévő mezőgazdasági területek mintái alapján arról számoltak be, hogy az esőzések után magasabb a neonikotinoidok koncentrációja. Ez megerősíti azt a hipotézist, hogy az esőzések befolyásolják a neonikotinoidok transzportfolyamatait és így a felhasználási területektől távolabb is képesek felhalmozódni. Kanadai felszíni víztestekben átlagosan 1–20 µg/L neonikotinoid koncentrációt mérnek, azonban esőzések alkalmával ez az érték már 200 µg/L körüli (Anderson és mtsai., 2015).

A neonikotinoidok fő felhasználási területe a kukorica, gyapot, olajrepcse, napraforgó és cukornád haszonnövények kártevőinek gyérítése. Mindezt a kémiai tulajdonságaik (gyorsan ható, talajperzisztens szerek) és a fizikai paramétereik (szagsemlegesség, jó vízdékonyság, többféle alkalmazási mód) is elősegítik. Sikereik titka a hatásmechanizmusukban rejlik, ugyanis a régebbi rovarölőszerekkel ellentétben - melyek csak a növény felületén tapadtak meg, ezáltal hatásfokuk a növényi felületekről való lemosódás miatt gyorsan csökkent – az újfajta nikotin-típusú hatóanyagokat tartalmazó szerek felszívódnak a növényi szövetekben, az egész növényben eloszlanak (floém, xilém transzporttal a pollenben, nektárban és a guttációs cseppekben is megjelennek), ezért szisztémikus inszekticideknek is nevezik őket (Bromilow és mtsai., 1990 ; Gibbons és mtsai., 2015; Mörtl és mtsai., 2017, 2019, 2020). A guttáció - vagy cseppkiválasztás - megnövekedett hőmérséklet és páratartalom, nedves talaj, valamint magas gyökérsnyomás esetén valósul meg akkor, amikor a növény gázcserenyílásai zárva vannak (Hoffmann and Castle, 2012). Nagyobb gyakorisággal fordul elő egyszikűeknél, mint kétszikűeknél (Joachimsmeier és mtsai., 2012). Korábbi kutatások a guttációs folyadékban cukrokat és szervesanyagokat is kimutattak (Goatley and Lewis, 1966). Ezenfelül aminosavak, fehérjék és szervesanyagok is jelen lehetnek a guttációs folyadékban (Pilot és mtsai., 2004).

A guttációs cseppek neonikotinoid-tartalmát célzó vizsgálatokat a Greenpeace környezetvédelmi szervezet is végzett. Poncho®-val (hatóanyag: KLO) és Cruiser®-rel (hatóanyag: TIAM) csávázott magyar kukorica vetőmagokat vettek górcső alá. A vizsgálatok kimutatták, hogy a Poncho-val kezelt vetőmagok guttációs folyadéka (max) 11,709 mg/L KLO-t (0,5-1,0 mg/L állandósult koncentráció), míg a Cruiser-kezelt magok (max) 55,26 mg/L TIAM-et (0,8 mg/L állandósult koncentráció) tartalmaztak. Ebben a vizsgálatban is megfigyelhető volt a TIAM mellett 6,794 mg/L KLO. A TIAM-kezelés azért is veszélyes, mert bomlásterméke, a KLO szintén kifejti (nem kívánt) hatásait (Simon Gergely, Christiane Huxdorff, 2013a).



5. ábra: A guttációs folyadék neonikotinoid-koncentráció-változása szántóföldi kukoricatáblákban (Simon és mtsai., 2013).

A neonikotinoidokkal kezelt kukorica levelének guttációs folyadékát mások is vizsgálták: TIAM-ot és KLO-t 100 mg/L, míg IMI-t 200 mg/L koncentrációban mutattak ki (Girolami és mtsai., 2009). Megint mások nagyságrendileg azonos eredményt kaptak: IMI 346 mg/L, KLO: 102 mg/L, TIAM: 146 mg/L maximális koncentrációban találtak neonikotinoid-maradványt (Tapparo és mtsai., 2011). Az átlagos koncentráció értékek a következőképpen alakultak: IMI ($47 \pm 9,9$ mg/L), KLO ($23,3 \pm 4,2$ mg/L), TIAM ($11,9 \pm 3,3$ mg/L) (Girolami és mtsai., 2009).

A gutációs folyadék TIAM koncentrációja a talaj nedvességtartalmával fordítottan arányos: 14-155 mg/l nedves, míg száraz talajban 34-1154 mg/l-t mértek (Tapparo és mtsai., 2011). Az 1,25 mg/mag KLO-val kezelt kukoricatáblán vett gutációs folyadékmintákban egy nappal vetés után átlagosan 15,9 µg/L, maximálisan 30 µg/L KLO-t tartalmaztak.

II/6/2. A neonikotinoidok ökototoxicitása

A vízi szervezetek releváns tesztalanyok a peszticidek ökotoxikológiai tesztelésének, mert közvetlenül ki vannak téve a szennyezésnek, gyors válaszok kialakítására képesek. Ezáltal nemcsak toxicitási információkat nyerhetünk, hanem gerincesekre és végsősoron az emberre vonatkoztatott hosszútávú hatásokra is következtetni tudunk (Ma és mtsai., 2019). Lehetséges, hogy azonos családba, vagy nemzetségebe tartozó fajok más-más biológiai, biokémiai válaszokat adnak egyazon kémiai anyag expozíciója esetén, de olyan faktorok, mint az idő, dózis, koncentráció, a vizsgált szervezet életkora, hőmérséklet, pH, sótartalom változásai hozzájárulnak az eredmények fajsúlyához (Yamamuro és mtsai., 2019). Az ökotoxikológiában leggyakrabban használatos küszöbkonzentrációk az EC₅₀, LC₅₀, LD₅₀ és a NOAEL. Ezek jelzik a hatóanyagok azt a koncentrációját, vagy dóziséját, amely a kísérleti alanyok számának felénél hatást, vagy halált vált ki, illetve jelzi a megfigyelhető káros hatást még nem mutató dózisszintet. A gerinctelenek vizsgálatának természetvédelmi vonatkozásai közé sorolandó kulcsszerepük a táplálékláncban, a trófikus szintek közötti metabolikus energiaáramlás biztosítása, valamint szaprofita életmódjuk. Ideális teszt- illetve modellszervezetté teszi a gerinctelen fajokat a fentiekén túl, hogy gyorsan szaporodnak és nem igényelnek szofisztikált tartási körülményeket (Rittschof and McClellan-Green, 2005).

A csávázószer elporosodásával keletkező por a növények felületén megtapadhat, majd (esővízben) feloldódva a szántóföldekről a tavakba, folyókba transzportálódhatnak. Ezek a

folyamatok lehetővé teszik, hogy a felhasználási területtől sokkal távolabbra is eljussanak a neonikotinoidok, ami az adott ökoszisztéma sérülékenységétől függően akár nagyfokú természeti károkhoz is vezethet. Ilyenek például a tápláléklánc egyensúlyának, szerkezetének, dinamikájának felborulása (halak, kétéltűek, hüllők, madarak éhezése az ízeltlábú közösségek összeomlása miatt), valamint a tápanyag-körforgalomban bekövetkezett változások következtében (Sánchez-Bayo és mtsai., 2016a; Basley and Goulson, 2018; Raby és mtsai., 2018a; Yamamuro és mtsai., 2019). Az még nem ismert, hogy ezek a szervezetek milyen mértékben szennyeződnek neonikotinoidokkal a kültakarójukon keresztül, táplálkozás, vagy légzés útján, de globális tapasztalati tények bizonyítják, hogy ez bekövetkezik.

A neonikotinoidok globális, nagy volumenű, évtizedek óta tartó felhasználása, környezetbe juttatása permet- és csávázószerként, talajgranulátumként való forgalmazása, a nem célszervezeteket érintő problémák, mind indokoltá teszik az ökotoxikológiai vizsgálatok folytatását, tökéletesítését. Hiszen évtizedekig biztosnak tűnt, hogy nincs káros hatásuk a nem célzott fajokra, mivel a szokásos modellszervezetek nem mutattak szignifikáns toxicitást, mint utóbb kiderült azért, mert nem vizsgálták kellően érzékeny fajokon (Sánchez-Bayo and Tennekes, 2020).

Összetett probléma annak megértése, hogy az állatok hogyan képesek sikeresen megbirkózni ezekkel a vegyületekkel, és hogyan tudnak megfelelő adaptív válaszokat adni a viselkedési szintektől a molekuláris szintekig. Kimutatták ugyanis, hogy a toxikus hatások fokozódhatnak még az akut tesztekben alkalmazott kezelési koncentráció, kisebb exponált dózisok esetében is, ami azért lehetséges, mert késleltetett hatások léphetnek fel a kezelés alatt és a kezelést követően is, így a kontaminált populáció késleltetett helyreállása figyelhető meg (Beketov and Liess, 2008; Song és mtsai., 1997; Benton és mtsai., 2017; Whitfield-Aslund és mtsai., 2017). Később a méhekre irányult a figyelem, hiszen arányosság volt megfigyelhető a neonikotinoidok alkalmazása és a gazdasági értelemben is hasznos méhkolóniák pusztulása között (ún. kolónia-

összeomlási zavar, Colony Collapse Disorder). Angliai kutatók 62 vadméh faj 18 év alatt összegyűjtött előfordulási és elterjedési adatai és a neonikotinoidokkal kezelt repce vetőmag felhasználásának adatai között kerestek összefüggéseket. Arra az eredményre jutottak, hogy a neonikotinoidokkal kezelt repce pollenjével táplálkozó vadméhek körében sokkal gyakoribb volt az egyedszám csökkenés (Woodcock és mtsai., 2016). Michelle Hladik és munkatársai Észak-Kaliforniában az 1990-es évektől kezdődően vizsgáltak lepkepopulációkat, majd végül korrelációt véltek felfedezni a neonikotinoidok térnyerése és a lepkepopulációk pusztulása között (Forister és mtsai., 2016).

A szisztémikus növényvédőszer a kezelt növény élettani funkcióit nem befolyásolja, ellenben a növényt fogyasztó, vagy a növényrel kontaktusba kerülő állati szervezetek (főként gerinctelenek) számára szubletális, letális körülményeket idéznek elő (Bonmatin és mtsai., 2015). Az Európai Élelmiszerbiztonsági Ügynökség (EFSA) 2013-as jelentéseiben megfogalmazottak választ keresnek a növényvédő szerek potenciális kockázatára a méhek esetében. Egy hónappal a vetést követően a kukoricából származó guttációs folyadék a hatóanyagok hígulásának, lebomlásának, (nem célterületre történő) transzportja ellenére még mindig tartalmazhatja az LD₅₀ dózisu növényvédő szereket a különböző méhfajok számára.

Tény az is, hogy az elfogyasztott guttációs folyadék akár több nagyságrenddel is kevesebb lehet, mint a begyűjtött vízmennyiség, valamint a guttációs folyadék a reggeli órákra elpárolog, a fenti adatok tükrében mégis elmondható, hogy a guttációs folyadék jelentős mérgező veszélyforrás lehet a méhek számára.

Hasonló vizsgálatokat végeztek mások is (Sterk és mtsai., 2016). Ebben a tanulmányban leírtak szerint azonban nem volt tapasztalható semmilyen szignifikáns változás a KLO kezelés hatására, ami szöges ellentétben áll Rundlöf és mtsai. (2015) által közölt eredményekkel. Az eltérést okozhatja, hogy nem ugyanazon vetési időszakú (téli, tavaszi) repcén végezték a vizsgálatokat. A neonikotinoid hatóanyag Sterk és munkatársainak kísérleti területéről elszivárgott a talajba és

a felszín alatti vízbázisba, ezért a tesztszervezetek számára nem volt hozzáférhető, ily módon valószínűsíthető, hogy ez a tanulmány nem szolgáltat releváns eredményekkel.

Összességében elmondható, hogy a neonikotinoidok agrárterületeken mérhető környezeti koncentrációja (<3,5 ng/g) a felnőtt méhegyedek letalitási arányát ugyan nem befolyásolja szignifikánsan, azonban szignifikáns szubletális változásokat idéz elő, amely kihat a kolónia fenntartásához szükséges szaporodási és rajépítési képességre is. A kiváltott hatások száma és mértéke természetesen függ az exponált neonikotinoid koncentrációtól, ami terepi viszonyok között függ a humán (vetés ideje, módja; neonikotinoid kezelés dózisa, időtartama, módja) és természeti (lokális klimatológiai, hidrogeológiai, geológiai viszonyok) tényezőktől, valamint, hogy a nem célfajok tudnak-e táplálkozni nem neonikotinoid kontaminált területen és ha igen, milyen mértékben.

A vetőmagok csávázásával ez a hatás még inkább biztosított: A vetést követően a bevonat vízben feloldódik és a növény a rovarirtószer 80-98%-át felveszi, majd a szállítószöveteken keresztül a szárba, levélbe, virágba, pollenbe is eljut és ott akár több hónapig is kifejti hatását. Ha a hatástartam alatt a rovarok a növényt rágnak vagy szívogatják, a növény szövetéből az inszekticid kifejti letális hatását a rovarra.

Kimutatták, hogy a ciano-szubsztituált neonikotinoidok (ACT, TIAK) kevésbé toxikusak a méhekre, mint a nitro-csoporttal rendelkezők (IMI, TIAM) (Arena and Sgolastra, 2014).

Az alábbiakban bemutatott táblázatok a neonikotinoidok ökotoxicitását tárják fel a legnépszerűbb gerinctelen és gerinces teszt- és modellfajok vonatkozásában. A teljesség igényére való törekvéssel összeállított, részletes táblázatokat a Függelék című fejezet tartalmazza.

Fajnév	Hatóanyag	Koncentráció	Expozíciós idő (nap)	Hatás	Referencia
<i>Neocaridina denticulata sinensis</i> (cseresznye garnéla)	IMI	< 31,25 µg/l	2-4	mozdulatlanság, lassú szívverés, csökkent kopolyúventilláció, halál	Raby és mtsai, 2018
	IMI	65-133 mg/l	2	LC ₅₀ dózis	Sánchez-Bayo és Goka, 2006
ágascsápú rákok (pl: <i>D. magna</i>) és kagylósrákok (pl: <i>Hungarocyparis madarászai Örley</i>)	IMI	9 µg/l	1	viselkedésbéli anomáliák	Rabyés mtsai, 2018a
	TIAM				
repülő rovarok	IMI		14	vedlés gátlása	Macaulay és mtsai, 2019
	KLO		21		
	TIAM		7		
elevevnszülő kérész (<i>Cloeon dipierum</i>)	IMI	6 µg/l	4	mozdulatlanság	Camp és Buchwalter, 2016; Macaulay, Buchwalter és Matthaei, 2020
	IMI		4		
<i>Isonychia bicolor</i>	IMI	6 µg/l	4	mozdulatlanság	Camp és Buchwalter, 2016; Macaulay, Buchwalter és Matthaei, 2020
	IMI		4		
<i>Hexagenia azteca</i>	IMI, TIAM, ACT	1 µg/l	28	mozdulatlanság	Bartlett és mtsai, 2018, 2019
	ACT, TIAM	10 µg/l		növekedésgátlás, zavart viselkedés, halál	

<i>Chironomus riparius</i>	többféle neonik	625 ng/l	10	oxidált glutation-diszulfid (GSSG) és a redukált glutation (GSH) formák közötti egyensúly felborulása, megnövekedett malondialdehid (MDA) szint, csökkent lipidperoxidáció, oxidatív stressz	Njaturvety Chandran és mtsai, 2018
				Ca2b homeosztázis egyensúly felborulása, mitokondriális diszfunkció az nAChR-ek aktiválódása miatt	Wei és mtsai, 2020
<i>Chironomus diluvius</i>	IMI, KLO, TIAM	14, 40	2	A hímemű egyedek arányának növekedése, a kikelési hatékonyság csökkenése. Az IMI és a KLO krónikus toxicitása összenézhető ezen faj esetén. A TIAM hasonló változásokat csak egy nagyságrenddel töményebb oldatban történő inkubálás során mutatott.	Cavallaro és mtsai, 2017
				az életképesség-vizsgálatokban a növekedés és a biomassza termelési érzékenyebb végpontok, mint a halálozás	Prosser és mtsai, 2016
<i>Lamprolitis fasciata</i> (hullámos kagyló)	IMI, KLO, TIAM, TIAK, ACT, DNF	10 µg/l	4	megemelkedett GST, csökkent Ache szint, továbbá a szuperin, a szuperoxid-dizmutáz (SOD), az ATP-szintetáz béta-alegységeinek megnövekedett expressziója, valamint a metallo-endopeptidáz, az L-azokorbál-oxidáz transzporter, a kollagén alfa-4 és alpha-6-csökkenő szintje	Ewerc és mtsai, 2020
				8 nap akkumuláció, 4 nap elimináció	ACT < IMI < TIAM < KLO
<i>Saccostrea glomerata</i>	IMI	5,30 µg/l	4	a teljes szöveti zsírtartalom csökkenése	Butcherine és mtsai, 2020; Hook és mtsai, 2018
<i>Penaeus monodon</i>	IMI	25, 50, 100 mg/l	0,083	redukált légzőlánc-aktivitás és tisztási sebesség	Bowrick és mtsai, 2017
<i>Penaeus monodon</i>	IMI	100 mg/l	1	szívritmus lelassulása	
<i>D. magna</i>	Mospilan 20 SP				

nagy moecárcsisiga (<i>Lymnaea stagnalis</i>)	Mospilan 20 SP	10-1000 mg/l	A TIAK 10 mg/L koncentrációban blokkolta a serkentő posztiszinaptikus potenciálok közel 90%-át; a TIAM 100 mg/L töménységben csak 15%-kal csökkentette a posztiszinaptikus válaszokat	Velovszky és mtsai, 2015	
	Apaces 50 WG				
	Actara 240 SC				
Calypso 480 SC	Kohinor 200 SL	1, 10 mg/l	1, 6, 12, 14, 25, 32	Megrövedett MXR-aktivitás	Velovszky és mtsai, 2018
	Apaces 50 WG				
<i>Dreissena bugensis</i>	Actara 240 SC	0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 mg/l	1, 2, 3, 4	csökkent lipid-peroxidáció (kataláz aktivitás), viselkedési változások	Stara és mtsai, 2019
	Calypso 480 SC				
	Kohinor 200 SL			vérnyirokban (hemolimfa) és az emésztőmirigyben bekövetkező szignifikáns sejtlehalás és redukált SOD-aktivitás, továbbá a kopolytubán a kataláz enzimaktivitás is csökkent, lizoszomatikus lipofuscin felhalmozódás történt	Stara és mtsai, 2020
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAL YPSO 480 SC	1;10;100 mg/l	20 nap akkum. 10 nap elim.	antioxidáns-, és biotranszformációért felelős enzimek aktivitásának emelkedése, mely az oxidatív stressz állapotának leküzdésére irányul	Contardo-Jara és Gessner, 2020
kaliforniai feketeferreg (<i>Lumbriculus variegatus</i>)	CONFIDOR 200 SL (200µg/L IMD)	0,1;1;10 µg/l	1		

9. táblázat: Példák a gerincteleneket érintő neonikotinoid terhelés fiziológiai hatásaira.

A szubletális viselkedésbeli változások leírásához vízi szervezetek esetén az úszási aktivitás vizsgálata, mely során az úszott táv, mozdulatlansági időtartam és egy sor más paraméter is elemezhető (Faria és mtsai., 2011) adekvát, mert a mozgási (úszási) aktivitás (lokomóció) a legérzékenyebb vizsgálati végpontnak tekinthető (Raby és mtsai., 2018).

A szubletális toxicitás egyik általános jellemzője a hőmérsékletfüggés. Azonban az IMI hőmérsékletfüggetlen toxicitást mutat az eleven szülő kérész (*Cloeon dipterum* Linnaeus, 1761) exponálásakor mind akut (4 nap), mind krónikus (28 nap) kezelés esetén. Felállították azt a hipotézist, miszerint a trópusi égvői vízi rovarok nagyobb érzékenységet mutatnak a peszticidekkel való kontamináció során, mint a mérsékelt égvőben élő rokon fajok (Castillo és mtsai., 1997). Ehhez hozzájárulhat a vegyszerek eltérő felhasználási módja, különböző összetétele a formázószereket illetően, mert a formázószerek nagymértékben befolyásolják a biológiai hozzáférést (Malev és mtsai., 2012). A *Hyaella* is tökéletes példát szolgáltat arra, hogy a formázószerek szignifikánsan befolyásolják (legtöbbször növelik) az aktív hatóanyag toxicitását (Stoughton és mtsai., 2008)

A neonikotinoid-terhelésre adott fiziológiai válasz dózisfüggését vizsgálva a repülő rovarok vonatkozásában akut kezelések során a tegzesek és a kérészek rendje is nagyfokú érzékenységet mutatott (Roessink és mtsai., 2013). Olyan komplex projektben is vizsgálták a neonikotinoidok ökotoxicitását, melynek során 30 édesvízi teszt faj egyedeit exponálták akut és krónikus időtartamokban. Eredményül kapták, hogy a halak és az elsődleges fogyasztók a legkevésbé érzékenyek ezen szerekre, átlagos $EC_{50} > 80$ mg/L, amely már a környezeti koncentrációnál magasabb. A kerekférgek, gyűrűsférgek hasonló, $EC_{50} > 100$ mg/L érzékenységgel bírtak, a legérzékenyebbek a rovarok és a rákok bizonyultak: $EC_{50} < 1$ mg/L. (Finnegan és mtsai., 2017). A *Hyaella azteca* (Saussure, 1858) felemáslábú rákok rendjébe tartozó faj egyedeit rövid (7 nap) és hosszútávú (28 nap) kitettség által kiváltott mérgezési tünetek szerint vizsgálva elmondható, hogy az ACT és a KLO már 7 nap alatt szignifikáns toxicitást okozott, míg a TIAM és IMI kevésbé volt toxikus ez idő alatt (Bartlett és mtsai., 2018, 2019). Ha az adott xenobiotikum képes az adott tesztállat viselkedését környezeti releváns koncentrációban negatívan befolyásolni, az a gyakorlatban komoly következményekkel jár az egyed feletti

szerveződési szinteken is, hiszen a mérgezett példányok mindennemű társas viselkedése alapjaiban változik meg. Ez kihat többek között a fajfenntartó mechanizmusokra.

A Ca²⁺ jelátvitel vizsgálata (fenti táblázat része) azért fontos, mert blokkolása esetén a cAMP transzdukciója nem megfelelő az ATP-ből, ez megakadályozhatja az LTP útvonalat, mely a memóriával és a tanulással függ össze. A mitokondriális diszfunkció az AMPK jelátvitel megszakítását és oxidatív stresszt is okozhatja. Az oxidatív stressz által okozott DNS-károsodás végül az élőlények halálát okozhatja (Wei és mtsai., 2020).

Szintén fontos, ha a neonikotinoidok hatását megvizsgáljuk keverék formában is, amikor egyszerre többféle szert adunk a kísérleti organizmusoknak, mert a terepi alkalmazáskor gyakran fennállhat az az állapot, amikor egy adott (vizes élőhely közelében lévő) művelési területre többféle neonikotinoidot is kijuttatnak. Az ilyen jellegű kutatások kimutatták, hogy az egyféle, vagy egyidőben többféle kijuttatott neonikotinoid ökotoxikológiai hatása szignifikánsan nem különbözik, ami optimális az élővilág és a gazdák szempontjából is, akik ezáltal költséghatékonyságukat tudják növelni (Maloney és mtsai., 2018).

A szitakötők rendjébe tartozó kék légivadász (*Ischnura elegans*; Van der Linden, 1820) kísérleti alany TIAK-ra vonatkoztatott érzékenységét vizsgálták környezetileg releváns koncentrációban kimutatandó, hogy a labor kultúrában nevelt, vagy a természetből fogott példányok mutatnak nagyobb érzékenységet az anyagra. Kimutatták, hogy a természetből fogott egyedek érzékenysége sokkal nagyobb volt, mint a laboratóriumban nevelt társaiké, ebből következtethetünk arra, hogy a neonikotinoid inszekticidek kulcsszerepet játszanak a szitakötő alrendek fajainak denzitás-csökkenésében (Barmantlo és mtsai., 2019). Ez a mi kutatásunk számára azért tekinthető releváns információnak, mert mi is természetből fogott *D. villosus* példányokat használtunk kísérleteink során.

A zöld mezeipoloska (*Closterotomus norwegicus*; Gmelin, 1790) célfajnak tekinthető a mezőgazdasági védekezés szempontjából, hiszen számos gazdaságilag fontos növény

kártevőjeként ismert (Coleman és mtsai., 2008; Lu és mtsai., 2010; Gross and Rosenheim, 2011). A *Creontiades dilutus* (*C. dilutus*; Stål, 1859) és *Chironomus riparius* (*C. riparius*; Meigen, 1804) lárva és imágó egyedein a fentiekén kívül végeztek még vizsgálatokat a neonikotinoidok nAChR-hez való kötődésük mivoltját illetően is. Ehhez radioaktív IMI-t használtak (^3H -IMI). Kimutatták, hogy lárva állapotban a receptorsűrűség és a kötési affinitás is jellemzően nagyobb, mint kifejlett állapotban. E két tényező kulcsfontosságú a neonikotinoidok által okozott biokémiai elváltozások következtében létrejövő mérgezési események lefolyásában (Maloney és mtsai., 2021).

Egyes kutatási eredmények szerint az IMI (és véleményem szerint a KLO is) tápanyaghiányt eredményezhetnek a felsőbbrendű rákoknál márkörnyezeti koncentrációban is. Ez a jelenség azzal függ össze, hogy ezek a szerek hozzájárulnak a táplálékmegragadás sikerességének csökkenéséhez az ingerületvezetés és közvetve a viselkedés megváltoztatásával (Hook és mtsai., 2018; Butcherine és mtsai., 2020).

Mivel a Mospilan 20 SP (hatóanyaga: 20% ACT) szántóföldi és kiskerti alkalmazása napjainkban is folyamatos, valamint perzisztens hatóanyagról van szó, ezért potenciális neuromodulátorként tekinthetünk rá (Bownik és mtsai., 2017).

A vízi ökoszisztéma részét képező gerinces fajok neonikotinoid terhelésének nyomon követése szintén fontos az ökotoxikológiában, mivel olyan vízi gerincesek, mint pl. a halak, az emberrel közvetlen kapcsolatba kerülhetnek. Bár a neonikotinoidokat úgy fejlesztették ki, hogy a gerincesek érintettsége statisztikailag irreleváns legyen, mégis találunk ellentmondásokat a gyakorlatban.

Fajnév	Embrió kora (hpf)	Hatóanyag	Koncentráció	Expozíciós idő (nap)	Hatás	Referencia
Zebrahal (<i>Danio rerio</i>)	6-120	ACT	263 mg/l		szignifikáns mortalitás és teratogenitás, gerinc fejlődési rendellenessége, károsodott motoros funkciók	Ma és mtsai., 2019
	felelőtt	IMI	100-1000 µg/l	21	oxidatív stressz és bélmérgezés, emelkedett CAT és SOD-szint	Luo és mtsai., 2021
			0,3-5 mg/l	7 - 28	GST és CAT-enzimek emelkedett szintje csak a vizsgálat vége felé kezdett csökkenni, míg a SOD-aktivitás megnövekedését követően hamar csökkenésnek indult,	Ge és mtsai., 2015
			>1,25 mg/l	21	a reaktív oxigénformák (ROS) és a malondialdehid (MDA) koncentrációjának emelkedését, ami oxidatív stresszmarker, Ezen felül DNS roncsolódás is végbement	
	4 óra – 5 nap	IMI és nikotin	2,79 és 3, 72 mg/l		Az IMI szignifikánsan csökkentette az úszási aktivitást, míg a nikotin a szenzomotoros funkciókat befolyásolta ugyan, a mozgási aktivitást nem változtatta meg szignifikánsan,	Crosby és mtsai., 2015
	5	IMI	0,1;1;10 mg/l		megnövelt halálozási arány, gátolt növekedés	Krishnan és mtsai., 2018
		TIAK	820 - 1640		DNS károsodás	Toğay és mtsai., 2021
		ciprodinil (fungicid)	310 µg/l			
		TIAM	0,3;1,25;5 mg/l	7 - 28	megemelkedett a ROS, MDA koncentráció és GST aktivitás, valamint csökkent CAT és SOD aktivitás továbbá oxidatív stressz és DNS roncsolódás	Sundukov, 2006; Yan és mtsai., 2015
		NIP	0,6;1,2;2,5;5 mg/l	28	antioxidatív enzimkoncentrációk csökkenését, DNS károsodást	
	lambda-cihalotrin, butaklor, atrazin, foxim (betiltott, vagy felhasználásban korlátozott herbicidek)			4	a lambda-cihalotrin LC ₅₀ értéke 3,1-380 µg/L, ugyanez a butaklor esetén 0,45-1,93 mg/L, az atrazin exponálásakor 6,09-34,19 mg/L koncentráció, valamint, hogy kombinált alkalmazásuk szinergista hatást vált ki	Wang és mtsai., 2017
kínai csele (<i>Gobiocypris rarus</i>)		IMI, NIP, DNF	100, 500, 2000 µg/l	60	genotoxikus, immuntoxikus, oxidatív stressz, DNS károsodás	Hong és mtsai., 2018
		IMI és DNF	500 µg/l és 2 mg/l		csökkent immunglobulin szám, a gyulladási folyamatokban szerepet játszó citokinek transzkripció szintjének alulszabályozottsága a környezeti releváns és magasabb koncentrációknak való krónikus kitettség az egyedek túlélési, fajfenntartási képességeit szignifikánsan negatívan befolyásolja	
kínai csele (<i>Gobiocypris rarus</i>)		IMI	2 mg/l		oxidatív stressz, emelkedett SOD-aktivitás	Tian és mtsai., 2018
		NIP és DNF	500 µg/l		emelkedett CAT aktivitás	
		NIP	100 µg/l		csökkent CAT aktivitás	
		DNF	100 µg/l		MDA koncentráció csökkenés, GST aktivitás emelkedés, DNS károsodás, emelkedett AchE-aktivitás (IMI)	
		IMI és DNF			MDA konc, emelkedés, GST aktivitás emelkedés, DNS károsodás, csökkent AchE-aktivitás	
sárga sügér (<i>Perca flavescens</i>)		TIAM - IMI kombinált	0; 8,33; 23,32; 132,8 ng/l	4 és 7	az UV-sugárzás a TIAM mortalitásra kifejett hatását növeli, IMI-vel pedig megnöveli a protein-koncentrációt és az AchE- aktivitást, csökkenti a lipid-peroxidációt	Paquet-Walsh és mtsai., 2019
vörös lazac (<i>Oncorhynchus nerka</i>)		KLO	150 ng/l – 150 µg/l	120	nincs szignifikáns hatás a kikelési, növekedési, deformációs és túlélési végpontok tekintetében - glükokortikoid 2-es receptort kódoló gén májban történő expressziójának elváltozása (150 µg/L)	Marlatt és mtsai., 2019

vörösszemű bölcsőszájúhal (<i>Australoheros facetus</i>)		IMI	100; 300; 2500 µg/l	1 és 2	a legnagyobb mértékű szöveti akkumuláció a kopoltyújukban, belekben májban és izmokban következett be	Iturburu és mtsai., 2017
afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>)		ACT és a λ-cihalotrin	15-20 mg/l	4	LC50 ACT 265,7 mg/L, λ-cihalotrin 830 ng/L	Houndji és mtsai., 2020
erdei béka (<i>Lithobates sylvaticus</i>)		KLO és TIAM	2,5 és 250 µg/l		környezeti koncentrációban nem zavarják meg a békafajok fejlődési stádiumai közötti átmenet normál lefolyását	Robinson és mtsai., 2019
északi leopárdbéka (<i>Lithobates pipiens</i>)		IMI és IMI-olefin (metabolit)			az IMI képes átdiffundálni a vér-agy gáton.	Campbell és mtsai., 2022
		KLO	230 ng/l 100 µg/l	56	oxidatív stressz nem váltott ki fejlődési rendellenességet vagy túlélési kockázatot	Robinson és mtsai., 2021
Erdei béka (<i>Lithobates sylvaticus</i>)		IMI és TIAM	> 10 µg/l		a kezelt egyedek viselkedése a ragadozótól való menekülés tekintetében szignifikánsan megváltozott, amiből következik, hogy amennyiben a békalárva neonik-kitettsége igazolható, a populáció fennmaradási esélyei nagymértékben romlanak	Lee-Jenkins and Robinson, 2018

10. táblázat: Példák a gerinceseket érintő neonikotinoid terhelés fiziológiai hatásaira.

Összefoglalva megállapítható, hogy az embrionális fejlődés kezdeti szakaszában a zebradániót ért IMI-expozíció maradandó neurális változásokat idéz elő, melyek a viselkedésben manifesztálódnak, továbbá az IMI - a növényvédő-szer gyártók állításaival ellentétben - a gazdaságilag jelentős gerinces szervezeteken is képes szignifikáns káros hatásokat előidézni. Ilyen például a táplálkozás gátlása, mozgászavar, csökkent termékenység, csökkent testméret a kérészekben és halakban, valamint immunszuppresszió.

II/7. A kísérleti állat

II/7/1. A kétpúpos bolharák (*Dikerogammarus villosus*) bemutatása – alkalmazásának okai



6. ábra: A *Dikerogammarus villosus* testszerkezet

forrás: Bacela, K., Grabowski, M., & Konopacka, A. (2008). *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894) (Crustacea, Amphipoda) enters Vistula - The biggest river in the Baltic basin. *Aquatic Invasions*, 3(1), 95–98. <https://doi.org/10.3391/ai.2008.3.1.16>

A kétpúpos bolharák (*D. villosus*) egy Balatont benépesítő invazív faj, mely az ízeltlábúak (*Arthropoda*) törzsébe, a rákok (*Crustacea*) altörzsébe, a *Multicrustacea* szuperoszályba tartozik, (amely monofiletikus csoport, vagyis olyan fajok összessége, amelyek egyetlen törzsfajtól származnak, minden egyes faj szűkebb rokonságban van egymással, mint azokkal a fajokkal, amelyek a csoporton kívül vannak). További besorolás: erszényes rákok (*Peracarida*) szuperrend, a felemáslábú rákok (*Malacostraca*) rend, a *Gammaridea* család, valamint a *Dikerogammarus* nemzetség.

A *Gammaridea* családba kulcsfontosságú fajok tartoznak (Woodward és mtsai., 2008), mert fontos szerepet töltenek be a víztest szervesanyag tartalmának lebontásában (Alonso és mtsai., 2009; Bundschuh és mtsai., 2013), valamint a halak és madarak táplálékforrásaként is funkcionálnak (Andrén and Wiklund, 2013; Blarer and Burkhardt-holm, 2016). A *Gammarus*-

ok meglehetősen érzékenyek a különböző környezetszennyező anyagokra (Bloor és mtsai., 2005; Felten és mtsai., 2008; Kunz és mtsai., 2010; Lahive és mtsai., 2015; Seethy, 2017). A felemáslábú rákok rendjét, mint az egyik legérzékenyebb fajegyüttest írták le nehézfémek és szerves szennyezők tekintetében (Wogram and Liess, 2001). Az ökotoxikológiai tesztekben ígéretes testállatok a vízminőség indikátorai is lehetnek (Garcia-Galan és mtsai., 2017). Kontamináció hatására ugyanis megváltozik a táplálkozási viselkedésük (is), amely a szubletális expozíció végpontjaként előre jelezheti a vízminőség megváltozását (Crane and Maltby, 1991). Mivel a *D. villosus* a világon az egyik leginvazívabb édesvízi ízeltlábú faj, erős hatást gyakorol a helyi élővilágra (Finnegan és mtsai., 2017; Miles és mtsai., 2017; Jermacz and Kobak, 2018; Sohn és mtsai., 2018; Ewere és mtsai., 2021; Thunnissen és mtsai., 2022) hatásviselőként való alkalmazása ígéretes eredményekkel szolgálhat úgy az ökotoxikológiában, mint más biológiai tudományban egyaránt.

A kétpúpós bolharák nagyobb folyókban (Duna, Dráva, Tisza és azok főbb mellékfolyói), valamint a Balatonban fordul elő hazánkban. Főként kövek, méretesebb kavicsok, fadarabok alatt találkozhatunk vele. A Balatonban a partvédő kövezés sekélyebb részeinek domináns faja, ott m²-enként akár több ezer egyed is előfordulhat (Muskó és mtsai., 2007).

A *Daphnia* fajok, különösen a *D. magna* környezeti kockázatértékeléseknél általánosan használt ökotoxikológiai modellállatok. Azonban nem indikálják megfelelően egy adott biotóp neonikotinoid terheltségét, mivel a fajok érzékenységi eloszlása (SSD) alapján a kladoцерák érzéketlennek tekinthetők neonikotinoidokra (Függelék: 30-32. ábra). A *D. magna* alkalmazása neonikotinoid tesztekben kockázati alulbecslést eredményezhet. Az ECOTOX adatbázisban szereplő, mozdulatlanság végpontra vonatkozó EC₅₀ koncentráció-tartomány 6029 - 85000 µg/L IMI hatóanyag exponálásakor (Hayasaka és mtsai., 2012).

II/7/2. Elterjedési területe, kültakarója, táplálkozása

A kétpópos bolharák elterjedési területe a Kaszpi-, az Azovi- és a Fekete-tenger kisebb sótartalmú részeit, valamint az ide torkolló folyók (köztük a Duna) alsó szakaszait foglalja magában. Az ún. ponto-kaszpikus elterjedés jellemzi, akárcsak az erszényes rákok közé tartozó többi hazai balatoni fajt. (Rewicz és mtsai., 2014). A Dunában az eredeti elterjedése a deltavidékre korlátozódott (Borza és mtsai., 2017).

Első hiteles magyarországi előfordulási adatai az 1970-es évekből származnak a Dunából, a Balatonban 2000 környékére tehető a megjelenése (Borza és mtsai., 2017). Gyors elterjedését elsősorban a hajózás segíthette elő (Bacela-Spychalska és mtsai. 2013).

A kifejlett példányok testhossza meghaladhatja a 2 cm-t is. Nevét a farokszelvények háti oldalán található két jellegzetes dudorról kapta. Érdekesség, hogy ez azonban a többi *Dikerogammarus* fajnak is a sajátja. Külalakja lehet foltmintás, vagy egyszínű.

A legsikeresebb inváziós fajok között tartják számon, ami elsősorban széles táplálékspektrumának köszönhető: a mikroalgák, bomló növényi részek, élőbevonat, juvenilis korban ürülék fogyasztása, vagy éppen a ragadozó (kannibalista) életmód is jellemző rá (Kelly és mtsai., 2002; Platvoet és mtsai., 2009). Sikeréhez hozzájárulhat gyors növekedése és szaporodása (Pöckl, 2009), valamint viszonylag kemény kültakarója is, amelynek köszönhetően a ragadozók inkább más bolharák fajokat részesítenek előnyben (Błońska és mtsai., 2015). Ez a tulajdonság gyűjtésénél előnyt jelent, nem kell tartani összenyomásuk, megsérülésük miatt.

VI/2. Jövőbeli kilátások - környezeti kockázat, helyettesítés, fenntartható kártevőirtás – EASAC jelentések alapján

A növényvédelemben alkalmazott vegyszereket a közvélemény a nemkívánatos környezetkárosító anyagok közé sorolja, aminek egyik oka az egyes rovarölő szerek megítélése. Az Európai Akadémiák Tudományos Tanácsadó Testületét (EASAC) (<https://easac.eu/about-easac>) a Svéd Királyi Tudományos Akadémia alapította 2001-ben, küldetése a tudományt a politika szolgálatába állítani, mert a tudományos alapokon meghozott politikai döntések révén érhető el a fenntartható jövő biztosítása. Tagjai között megtalálható a Magyar Tudományos Akadémia is. Az Európai Bizottság hívta fel az Európai Unió figyelmét arra, hogy a neonikotinoidok széleskörű profilaktikus használatának következtében - potenciális kártevő-fenyegetettség nélkül alkalmazzák az egész táblára, szórványosan vagy kis számban megjelenő kártevő ellen is - a háziméh, poszméh és a nem kolonizáló méhek továbbá más beporzó rovarok nagymérvű pusztulást (kolónia-összeomlási rendellenesség; CCD) mutatnak. A Bizottság rávilágított arra is, hogy nem csak rovarok, hanem a talajlakó és a vízi gerinctelenek is az érintett nem célszervezetek közé tartoznak. A profilaktikus kijuttatás miatt a művelési területeken keletkezett többlet növényvédőszer nem tölti be kívánt funkcióját, ellenben hatását a nem célterületeken élő nem célzott fajokon is kifejti. Mindezeket empirikus bizonyítékok támasztják alá, melyek közül számos példával szolgálunk mi is a korábbi fejezetekben.

Az integrált növényvédelem (Integrated Pest Management, IPM) a fenntartható mezőgazdaság, az egyre növekvő népesség miatt kulcsfontosságú, mert kombinálja a különböző biológiai, fizikai, kémiai gyérítési módszereket és a peszticidek nem profilaktikusan, hanem a kártevődenzitásnak megfelelően kerülnek kijuttatásra. Az IPM gazdasági előnye, hogy a gazdák az okszerű vegyszerhasználattal az erre szánt kiadásukat is csökkenthetik, ezzel együtt

a környezeti terhelést is mérséklék. A cél az, hogy az EU tagállamok egységes növényvédelmi rendszert alakítsanak ki.

A vegyszeres kezelés ideje alatt monitorozni kellene a kártevők gyűrülésének mértékét, majd amikor ez elér egy bizonyos határértéket, attól kezdve már csak fajra, helyre, mennyiségre specializáltan lenne szabad kijuttatni rovarölő-szereket, tehát csak ott alkalmazni a vegyszereket, ahol feltétlenül szükséges. Ez azonban nem újkeletű elképzelés, évtizedek óta megfogalmazott cél, ami azért nem vált napjainkra globálisan általánossá, mert összetettebb döntésekre, monitorhálózatra, a fenntartható gazdálkodásban érdekelt gazdákra lenne szükség hozzá, így nagyobb költségvonzata lenne. Az EASAC célja a gazdák szemléletváltásának elősegítése (pl: oktatással). A jelenlegi álláspont azonban az, hogy a globálisan növekvő népesség és a fejlődő országokat nem jellemző élelmiszerbiztonság miatt jelenleg a neonikotinoidok mezőgazdaságban betöltött haszna felülmúlja azok természetkárosító hatásait.

III. CÉLKITŰZÉS

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 késztetett 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* tesztállatban?
2. Milyen biokémiai elváltozások vezetnek a társas és individuális viselkedésformák megváltozásához?

Kitűzött célok:

1. Megvizsgálni a toxikus hatásokat vízi tesztorganizmeken 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.

Következtetések:

1. Az oxidatív stressz az AChE túlzott aktiválódását idézheti elő, ami depresszióval kapcsolatos viselkedésekhez vezethet. Vizsgálatunkban az AChE aktivitás gátlása nem a KLO nACh-ra gyakorolt közvetlen hatásának a következménye, hanem a szervezet általános károsodott fiziológiás állapotát tükröző közvetett hatás, amely a KLO koncentráció növekedésének is függvénye. A gátolt AChE azt jelezte, hogy a neonikotinoidok neurotoxicitása közvetlenül a *D. villosus* központi idegrendszerének mozgásért felelős idegdúcaiban idéz elő (irreverzibilis) változásokat. Az AChE aktivitás csökkenése részben kompenzálja a kolinerg transzmisszió funkcionális károsodását, ami a neonikotinoidok nAChR kötődéséből adódik.
2. Az MXR-mechanizmus képes kiüríteni a KLO-t a rákok szervezetéből.
3. Az MXR mechanizmust vizsgálva fény derült arra is, hogy a környezetbe kijuttatott, KLO-t tartalmazó permetszer (pl: Apacs 50 WG) már 4,5 ng/l koncentrációban mindössze másfél óra expozíciós időtartam alatt szignifiknsan csökkentette az MXR aktivitást. Nagyfokú kemostimuláció lép fel. Eredményeink alapján elmondható, hogy a vizsgált rovarölő szerek a természetes vizekbe jutva befolyásolják a nem célzott

szervezetek életműködéseit valamint, hogy a jelenleg forgalomban lévő peszticidek szelektivitása nem kellő mértékű.

4. A KLO-kezelések alkalmával azért nem jelentkezett szignifikáns változás a GST enzimaktivásban, mert az enzimátikus folyamatok során a GST enzimrendszer enyhén toxikus metabolitokat termel, amely gyorsan kiürül a szervezetből. Ez azért lehetséges, mert amennyiben a KLO-t az MXR képes lenne kellő mértékben eliminálni a szövetekből, nem jelentkeznének ilyen drasztikus mértékű mérgezési tünetek a kezelt csoportokban. Ezáltal feltételezhető, hogy a nem reagált GSH a kulcsa a megnövekedett GST-aktivitásnak IMI esetében, míg a KLO tekintetében a konjugátumok képződése lassabb, ami nem jelenik meg a GST-aktivásban.
5. A TIAK-ot az IMI-nél hatékonyabban detoxifikálja a GST enzimrendszer.
6. A TIAK akut toxicitás tesztekben kevésbé mérgező az ízeltlábú szervezetekre, mint az IMI. Ezt a szakirodalom alátámasztja, valamint a kereskedelmi forgalomból való két évvel későbbi kivonását is megmagyarázza.
7. Összefüggés van a megnövekedett GST aktivitás és a megváltozott AChE aktivitás között: az AChE a fokozott oxidatív stressz hatására aktiválódhatott. Ez a jelenség lehet felelős a központi idegrendszer és néhány más viselkedési funkció károsodásáért.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV/1. A kétpúpos bolharák példányok begyűjtése

Felnőtt (7-10 mm hosszúságú) kétpúpos bolharákat használtunk akut neonikotinoid expozíciós kísérleteink során hatásviselő szervezetként. Az egyedek begyűjtése Tihanyban, a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet területén, a tó litorális régiójában elhelyezkedő kövek alól történt. A faj példányai a megfigyelések alapján a közepes- és nagyméretű, egyenetlen formájú, kvagga kagylóval (*Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897)) borított köveket részesítik előnyben, rejtőzködő életmódjuk miatt ezek alá bújnak el leginkább.

IV/2. A kétpúpos bolharák tartása



7. ábra: A *Dikerogammarus villosus* tartási körülményei

A gyűjtést követően szűretlen, levegőztetett balatonvizet tartalmazó 10 literes akváriumokban akklimatizáltuk az állatokat, 100 egyed/tartály állománysűrűséggel, 16:8 órás fény-sötét ciklusban, $20 \pm 1^\circ\text{C}$ állandó hőmérsékleten. A kísérleteket (3, 5, 48 óra időtartam) a gyűjtéstől számított nyolcadik napon indítottuk el. Rejtőzködő életmódjuk biztosítása érdekében kis (10

mm átmérőjű) kerámia csöveket és közepes nagyságú köveket helyeztünk el az akváriumokban, ahová kvagga kagyló (*D. bugensis*; Andrusov, 1897) példányokat is tettünk. A kagylók kiváló vízszűrőként és kedvelt táplálékként is funkcionáltak a rákok számára. Az állatokat hetente kétszer sárgarépával (*Daucus carota. sativus* (Hoffm. Schübl. és G. Martens) *ad libitum* etettük, a kísérleteket megelőzően pedig két napig éhezettük őket.

IV/3. A neonikotinoidok visszamérése a kezeléseik során

A kísérletek során vett vízminták neonikotinoid tartalmának analitikai meghatározásához LC-MS méréseket végeztünk a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem Környezetudományi Intézet Agrár-környezettudományi Kutatóközpontjában (MATE-AKK). Younglin YL9100® HPLC rendszert használtunk, amely egy YL9150 auto-mintavevővel volt felszerelve. A hatóanyagokat C18 oszlopon (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) 40°C-on választottuk szét. Az UV-jeleket 252 és 269 nm-en rögzítettük. Az eluens áramlási sebessége 1,0 ml/perc volt, 10 perces izokratikus elúcióval (65:35=A:B eluensek, A=90% víz:10% MeOH, B=MeOH). A hatóanyagok mennyiségi meghatározása analitikai standard anyagok hígításával, kalibráció alapján történt 10-500 µg/l koncentrációtartományban. A visszanyerési eredményeink azt mutatták, hogy a tényleges koncentrációk mind a KLO, mind az IMI esetében $\geq 95\%$ voltak a névleges koncentrációkhoz képest.

A kontroll vízmintákban nem mutattunk ki neonikotinoidokat. E visszanyerési adatok alapján a KLO és az IMI kívánt expozíciós koncentrációja hozzávetőlegesen állandó volt a 2 napos expozíció során.

IV/4. Viselkedési vizsgálatok jellemzés

Minden eljárást a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet Állatkísérleti Tudományos Bizottsága által jóváhagyott PE_KTF/882-2/2018 határozat szerint végeztünk. Az adaptív viselkedési és

biokémiai válaszok teszteléséhez az állatokat (n = 10/kísérleti csoport) 700 ml űrtartalmú 600 ml szűretlen balatonvizet tartalmazó műanyag tartályokba helyeztük, és 2 napig különböző koncentrációjú neonikotinoid terhelésnek tettük ki. A kontrollcsoportban lévő egyedeket 600 ml szűretlen balatonvízben tartottuk a kísérletek időtartama alatt. A KLO-expozíció 4 kísérleti csoportja (1 kontroll és 3 kezelt) összesen n = 40 állatot tartalmazott ismétlésenként. Az IMI-expozíció 5 kísérleti csoportja (1 kontroll és 4 kezelt) replikátumonként összesen n = 50 állatot tartalmazott. Mind a KLO-, mind az IMI-expozíció esetében három ismétlés készült a kísérleti csoportokra.

Az akut hatások elemzését viselkedési szinten a mozdulatlansági idő és az úszási aktivitás végpontok értékelésével végeztük. (Boily és mtsai., 2013; Jemec és mtsai., 2007; Malev és mtsai., 2012; Qi és mtsai., 2018; Butcherine és mtsai., 2022).

A vizsgált rákfaj egyedein tesztelt neonikotinoidok (IMI, KLO, TIAK) expozíciója által bekövetkező - kontroll egyedekhez viszonyított - viselkedésbeli változások nyomonkövetése azért szükséges, mert ezáltal nem csupán az egyedszintű viselkedésformákban, hanem az egyedek egymás közti, társas interakciókban bekövetkező változásokat is tanulmányozhatjuk. A kísérletek során tiszta formában a következő kezelési koncentrációkat alkalmaztuk: KLO - 16, 32, 48 µg/l; IMI - 16, 80, 160, 250 µg/l; TIAK: 10, 30, 100, 250 µg/l 48 óra expozíciós időtartamban, tíz egyedből álló csoportokban. A hatóanyagok formázott készítmény formájában történő hatásvizsgálatait az Apacs 50 WG (*clothianidin* aktív hatóanyag-tartalom: 50 g/kg), valamint a Calypso 480 SC (*thiakloprid* aktív hatóanyag-tartalom: 480 g/L) inszekticideken végeztünk. Az expozíciós idő az Apacs esetében 3, illetve 1,5 óra, míg a Calypso használatakor 48 óra volt, tíz egyedből álló csoportokban. Az exponált Apacs koncentráció 3,9 ng/l, míg a Calypso-t a tiszta szerhez hasonlóan 10, 30, 100, 250 µg/l koncentrációban alkalmaztuk. Ezeket a kezelési koncentrációkat és időtartamokat alkalmaztuk

a GST és AChE vizsgálatokban is. A kezelési koncentrációk a készítmények tekintetében a hatóanyag-tartalomra vonatkoznak.

Az expozíciót követően 6 lyukú plate-be helyeztük az állatokat, az immobilizációs időt és az úszási aktivitást valamennyi csoportról a Fujifilm FinePix S5700 fényképezőgéppel készített 90 másodperces film (30 fps) alapján Fiji ImageJ 1.53q szoftverrel elemeztük. A program rögzítette a koordinátákat és automatikusan rekonstruálta a kísérleti állatok úszási pályáját a teljes plate területén.

A technikai részleteken túlmenően vizuális megfigyelést is alkalmaztunk: megfigyeltük a kezelt példányok kontroll egyedekhez viszonyított viselkedésbeli változását a kezelési idők alatt a kopulációs hajlam és a felvett testtartás tekintetében.

IV/2. A kísérleteink során felhasznált vegyszerek

Készítmények	kereskedelmi forgalmi alapengedély	Hatóanyag	Forrás
Apacs 50 WG	2020. január 31.	KLO: 50 g/kg	https://portal.nebih.gov.hu/visszavont-es-lejart-ervenyessegu-novenyvedo-szerek ; Arysta Life Science)
Calypso 480 SC	2020.08.03.	TIAK: 480 g/l	

IMI-t tartalmazó formázott szerhez a kutatás idő alatt már nem jutottunk hozzá, ezért ilyen irányú vizsgálatokat nem állt módunkban elvégezni.

A fehérje meghatározást Bradford-reagenssel (#B6916, Sigma- Aldrich) végeztük. Az akut kezelésekhöz HPLC minőségű KLO-t (CAS-szám: 111988-49-9; PESTANAL GRADE, Sigma-Aldrich), IMI-ot (CAS-szám: 138261-41-3; Sigma-Aldrich) és TIAK-ot (CAS-szám:

138261-41-3; Sigma-Aldrich) használtunk. Ezekből 1 mg/ml (KLO esetében), 0,5 mg/ml (IMI esetében) és 0,1 mg/ml (TIAK esetében) törzsoldatokat készítettünk desztillált vízben. Az MXR-aktivitás meghatározásához rodamin B fluoreszcens festéket (CAS-szám: 81-88-9; Merck) használtunk. A GST-aktivitás detektálásához szükséges vegyszereket GST Assay Kit (#CS0410, Sigma-Aldrich) formájában szereztük be, amely nátrium-foszfát puffert (PBS, 0.1 M, pH 6.5), L-glutation-t (redukált forma, GSH, 10 mM) és CDNB festéket (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 10 mM) tartalmazott. Az AChE-aktivitás mérésekhez felhasznált komponensek: nátrium-foszfát puffer (0.1 M, pH 7.2), DTNB (ditiobisz- (2-nitrobenzoát, #D8130, Sigma-Aldrich, 0.5 mM), valamint AcThI (Acetiltiokolin-jodid, #01480, Sigma-Aldrich, 0.5 mM).

IV/5. Teljes fehérjetartalom és enzimaktivitás meghatározása

Minden eljárást a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet Állatkísérleti Tudományos Bizottsága által jóváhagyott PE_KTF/882-2/2018 határozat szerint végeztünk. Az adaptív biokémiai válaszok teszteléséhez az állatokat (n = 10/kísérleti csoport) 700 ml űrtartalmú 600 ml szűretlen balatonvizet tartalmazó műanyag tartályokba helyeztük, és 2 napig különböző koncentrációjú neonikotinoid terhelésnek tettük ki. A kontrollcsoportban lévő egyedeket 600 ml szűretlen balatonvízben tartottuk a kísérletek időtartama alatt. A KLO-expozíció 4 kísérleti csoportja (1 kontroll és 3 kezelt) összesen n = 40 állatot tartalmazott ismétlésenként. Az IMI-expozíció 5 kísérleti csoportja (1 kontroll és 4 kezelt) replikátumonként összesen n = 50 állatot tartalmazott. Mind a KLO-, mind az IMI-expozíció esetében három ismétlés készült a kísérleti csoportokra.

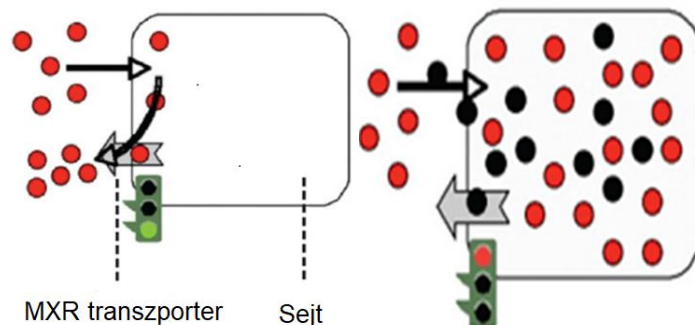
Az összfehérje-tartalom meghatározását korábbi munkáink alapján végeztük el (Vehovszky és mtsai., 2010; Győri és mtsai., 2017). Minden csoportból tíz felnőtt állatot homogenizáltunk TissueLyser LT (QIAGEN) készülékkel 45 g-n 5 percig 200 µl foszfát puffer sóoldatban (PBS, pH=7,4). A centrifugálás további 800 µl foszfát puffer sóoldat hozzáadását követően Heraeus

Biofuge Pico készülékkel 10000 g, 25 perc, 4°C körülmények között történt. A felülúszót használtuk fel a biokémiai mérésekhez (450 µl). A teljes fehérjetartalmat Bradford-teszt (#B6916, Sigma-Aldrich) segítségével 96 lyukú plate-ben mértük Perkin-Elmer Victor III készülékkel 250 µl teljes térfogatban, amely 5 µl felülúszót (mintát), valamint 245 µl Bradford-reagenst tartalmazott. A teszt alapja, hogy a Coomassie Brilliant Blue G fluoreszcens festék eredeti barna színe fehérjével alkotott komplex kialakulásával kékre módosul. Minél sötétebb a kék szín árnyalata, annál több fehérjét tartalmaz az adott minta. A mérések előtt kalibrációt végeztünk. A Bradford reagenssel készített hígítási sorból kapott kalibrációs görbe alapján számoltuk a minták fehérjetartalmát.

IV/6. MXR vizsgálat leírása

Az állatokat szűrt, 2 µM rodamin B-t tartalmazó balatonvízben inkubáltuk, 60 percig (terhelés). A rodamin B festék fényérzékeny mivolta miatt az 1 órás inkubációt sötét körülmények között kell végrehajtani. Ezt követően a rövid (3 perces) mosási fázis során szűrt balatonvízzel a felesleges festékanyagot eltávolítottuk a kültakaró felszínéről. A T_0 időpontban az állatok egy csoportját azonnal lefagyasztottuk a későbbi mérésekhez, amely során meghatároztuk a rodamin B teljes akkumulált koncentrációját. A rodamin inkubációban részt vevő többi egyedet két csoportra osztottuk, 100-100 ml-es alacsony profilú kristályosító csészékbe helyeztük. A kontroll csoportban lévő állatokat szűrt balatonvízben tartottuk. A rovarölő szer (APACS 50 WG) hatásait a rákegyedek harmadik csoportján vizsgáltuk az inszekticid szűrt balatonvizes oldatait használva. A további enzimvizsgálatok elvégzéséhez a kezelt és a kezeletlen állatokat az expozíciós időt követően (3 óra) lefagyasztottuk. Az MXR aktivitás követéséhez az akkumuláción alapuló módszert alkalmaztunk (Vehovszky és mtsai. 2018), ahol a rodamin B fluoreszcens festék szolgált modell P-gp szubsztrátként (Cornwall és mtsai., 1995; Smital and

Kurelec, 1997; Smital és mtsai., 2003; Faria és mtsai., 2011). A fent említett módszer lényege, hogy az inkubációs időtartam alatt a rodamin B gradiens-vezérelt felvételi mechanizmus révén akumulálódik a sejtközi térben. Az MXR méréganyag-eltávolító sejtszintű mechanizmust specifikus ATP-binding cassette (ABC) membrántranszport-fehérjék (permeábilis glikoprotein) teszik lehetővé, ún. aktív efflux pumpaként működnek a koncentráció-gradiens ellenében. Az energiaigényes folyamat széles szubsztrátspecifitással bír és valamennyi baktérium, gomba és állatfaj sajátja. A szöveti MXR aktivitás mérése adott időtartam alatt akumulálódott rodamine-B fényérzékeny fluoreszcens festék mennyiségének meghatározásán alapszik, a festék intenzitását mérjük, amit a T_0 időpontban meghatározott mintákhoz viszonyítunk. A mérés előnye, hogy így pontosabban meghatározható az MXR aktivitás, a másik, úgynevezett efflux-módszerhez képest. A T_0 csoport azonnali lefagyasztásával ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) képes a legnagyobb akumulált festékszintet megőrizni. Azért fontos ennek ismerete, mert az expozíciós időtartam alatt a kontroll mintában passzív diffúzióval csökkenhet akumulálódott festékkoncentráció.



8. ábra: Az MXR mechanizmus működése és gátlása. A védekezési folyamat akadálytalan működése esetén (bal oldal) a sejt működését veszélyeztető xenobiotikumok a sejtközi térbe jutnak pumpamechanizmus által, ahonnan a szervezetből eltávolításra kerülnek. Azonban vannak olyan anyagok (inhibitorok), melyek a mechanizmust részben gátolni képesek (jobb oldal). Az így sejtekben maradó méréganyagok mennyisége analitikailag meghatározható.

piros kör: kétirányú transzportfolyamatban résztvevő anyagok
fekete kör: egyirányú transzportfolyamatban résztvevő anyagok

Az efflux módszerrel nem a szöveti minták elemzését végezzük ugyanis, hanem az állatot körülvevő médiumból vett mintából határozzuk meg az MXR aktivitást. A médiumból vett minta tartalmazza azt a festékmennyiséget, mely a kísérlet időtartama alatt az állat szervezetéből távozott. Az egészben lévő állati minták szöveti homogenizálását követően (Tissuelyzer LT, Qiagen) 4°C-on 20 percig 8000 g-n centrifugáltuk (Biofuge Fresco, HERAUS) azokat. A felülúszó (250 µL) fluoreszcenciáját $\lambda_{ex} = 535$ nm-en és $\lambda_{em} = 590$ nm-en mértük (Victor 3 plate-olvasó, Perkin-Elmer), hogy meghatározzuk a szövetmintákban felhalmozódott rodamin B mennyiségét. A homogenizált szövetminták fehérje-koncentrációját meghatároztuk párhuzamos mintákban a Bradford-módszer alkalmazásával (Bradford 1976). Az akkumulált rodamin B mennyiségét fluoreszcens egység/szöveti fehérjetartalom mg-ban adtuk meg. A közölt Apacs kezelési koncentrációk voltak a kísérleteinkben azok a legkisebb töménységek, amelyek szignifikáns hatást eredményeztek a kísérleti alany viselkedési és biokémiai vizsgálatainak során. Az értekezésben a letalitási koncentráció-tartományokra történő utalások mind kísérleti tapasztalatokon alapulnak. Ha egy nagyságrenddel még kisebb (tized ng/l) kezelési koncentrációkat alkalmaztunk volna az Apacs exponálásakor, abban az esetben valószínűsíthetően a kísérleti alany nem mutatott volna szignifikáns változásokat a vizsgált végpontok esetében. Emelett az analitikai módszereink kimutatási határának a közelébe/alá jutottunk volna.

IV/7. GST aktivitás meghatározása

A GST-aktivitást GST Assay Kit (#CS0410, Sigma-Aldrich) segítségével vizsgáltuk 96-os plate-en 200 µl teljes térfogatban, amely 20 µl felülúszót (mintát), 180 µl nátrium-foszfát puffert (PBS; 0,1 M, pH 6,5) tartalmazott, amely magában foglalt 10 mM, 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB) festéket és 10 mM L-glutation (redukált forma, GSH) szubsztrátot. A GST katalizálja a szubsztrát konjugációját, tioétert képezve, amelynek mennyisége a fluoreszcens festék fény-abszorbanciájával arányos. Az abszorbanciát 340 nm hullámhosszon

25 °C hőmérsékleten 3 perc időtartamig 15 másodperces gyakorisággal mértük. A reakció linearitásáról az abszorbancia értékeknek az idő függvényében történő ábrázolásával győződünk meg. Az abszorbancia változását a diagram lineáris tartományának meredekségéből számítottuk.

A glutation-S-transzferáz (GST) egy olyan antioxidáns enzim, mely képes egy glutation molekulát egy elektrofil xenobiotikumra kén kötéssel szubsztituálni. Aktivitásának számítása az alábbi képlet alapján történik:

$$GST \text{ aktivitás}(\mu\text{mol/ml/min}) = \frac{\Delta A_{340}/\text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil}}{\epsilon_{mM} \times V_{\text{enz}}(\text{ml})}$$

A GST-aktivitás esetében az enzimaktivitást a percenként termelt tioéter mikromoljában fejeztük ki, milligrammnyi fehérjére vonatkoztatva.

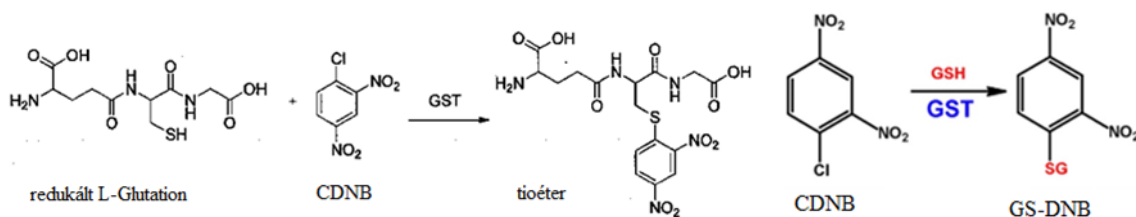
A fenti képletben szereplő paraméterek értékei a következők:

dil: a minta hígítási faktorszám

ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$): A CDNB konjugátum extinkciós együtthatója (ϵ) 340 nm-es hullámhosszon: $4,24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ A percenként keletkezett tioéter mennyisége a festék abszorbanciájával arányos.

V - a reakció térfogata: 96 lyukú lemezben (0,2 ml).

V_{enz} - a vizsgált enzimminta térfogata (0,02 ml)



9. ábra: A reakció során, amit a GST katalizál az L-glutation redukált formája konjugátumot képez a 1-kloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) molekulával. A reakcióban tioéter keletkezik melynek mennyiségét fluoreszcenciás technikával mérjük.

IV/8. AChE aktivitás meghatározása

Az AchE aktivitást (Ellman és mtsai., 1961) módszerét követve 250 μL össztérfogatban mértük 96-os plate-en, amely 25 μL felülúszót és 225 μL PBS puffert (0,1 M, pH 7,2) tartalmazott. A pufferben 0,5 mM ditiobisz-(2-nitrobenzoát) (DTNB) (#D8130, Sigma-Aldrich) és 7,5 mM acetiltiokolin-jodid (AcThI) (#01480, Sigma-Aldrich) volt oldva. Az AcThI AchE általi hidrolízise során tiolcsoport keletkezik, amely a DTNB-vel reagálva sárga színt (tionitrobenzoát) eredményez. A termék színintenzitását 405 nm hullámhosszon, 25 °C hőmérsékleten 3 perc időtartamig 15 másodpercenként mérjük. A mért fényintenzitást felhasználva határozzuk meg az enzimaktivitást az alábbiak szerint:

$$AChE \text{ aktivitás (nmol/min/ml vagy mU/ml)} = B / (\Delta T \times V) \times D =$$

B: a standard kalibrációs görbe alapján számított kolinmennyiség (nM)

ΔT : reakcióidő (min.),

V: a mintatérfogat (mL)

D: mintahígítási faktor

Egység definíció: az AchE aktivitás egy milliegyisége megfelel annak az enzim mennyiségnek, mely 1 nmol kolin egy perc alatt történő keletkezésében játszik szerepet pH=7.4 és 37°C hőmérséklet esetén. a DTNB extinkciós együtthatója $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a hullámhossz (l) 0.8 cm volt. Minden mérést Victor III plate-olvasóval (Perkin-Elmer, USA) végeztünk. A minták nélküli reakcióelegyet vakpróbaként használtuk. Az AchE-aktivitás esetében az enzimaktivitást a percenként, milligrammnyi fehérjére termelt hidrolizált acetilkolin-jodid mikromoljaként fejeztük ki. A minták nélküli reakcióelegyet vakpróbaként használtuk.

IV/9. Statisztikai elemzés

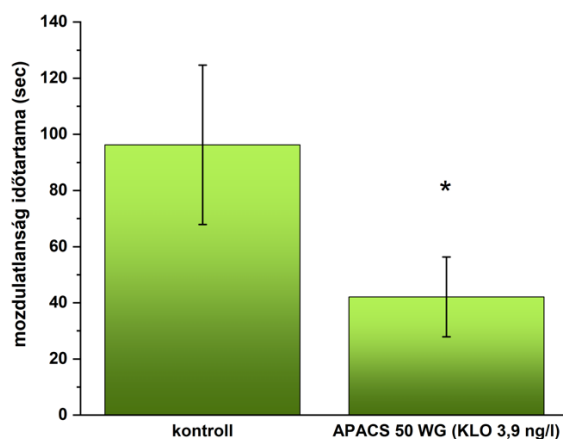
A statisztikai elemzést OriginPro 10.1.0.178 2024 szoftverrel végeztük (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA). Az adathalmaz normalitását Shapiro-Wilk teszttel, a csoportok közötti varianciák homogenitását Levene-teszttel vizsgáltuk. Mind a viselkedés, mind az enzimaktivitás mérésénél a kontroll és a kezelt csoportok közötti eltéréseket egyutas ANOVA-val (Tukey-teszt, Scheffe-teszt) elemeztük, mert mintasoraink normál eloszlásúak voltak, valamint a variancia-analízis nem mutatott különbséget. Az eltéréseket $p < 0,05$ (*) értéknél szignifikánsnak tekintettük, a szignifikancia erősségét továbbá $p < 0,01$ (**) és $p < 0,001$ (***) értékekkel jellemeztük.

V. EREDMÉNYEK

Napjainkban, közel húsz évvel az első neonikotinoid terepi vizsgálatok megkezdése után is még kevés adat áll rendelkezésre a vízi gerinctelen nem célzott szervezetekre gyakorolt hatásokról. Az irodalom alapján a leggyakrabban használt modellállatok nem mutatnak kellő érzékenységet ezekre a szerekre. Munkánk során ezért egy invazív balatoni gerinctelen ízeltlábú, a kétpúpós bolharák (*D. villosus*) kifejlett példányait használtuk, mert a tapasztalataink és az irodalmi adatok szerint is az egyik legérzékenyebb tesztállatnak bizonyult a neonikotinoid-terhelések esetében. Kísérleteinket akut expozíciós vizsgálatokra alapoztuk, egyed és molekuláris szintű végpontok megfigyelésével szubletális hatásvizsgálatokat végeztünk.

V/1. A Neonikotinoid-nak kitett *Dikerogammarus villosus* viselkedésbeli változásai

A kereskedelmi forgalomból munkánk kezdetén még beszerezhető KLO tartalmú APACS 50 WG rovarölő szer akut 3 óra expozíciós időtartamú, mindössze 3,9 ng/l koncentrációjú balatonvizes oldatának hatását elemeztük az egyedek mozgási aktivitás változásának tekintetében (**9. ábra**). Ez volt az a legkisebb koncentráció, mely szignifikáns eltérést mutatott a kontroll csoporthoz képest.



9. ábra: KLO hatóanyagú rovarölő szer (APACS 50WG, 3,9 ng/l) hatása 3 óra kezelési idő alatt a *Dikerogammarus villosus* mozgásaktivitására. Az úszási tevékenységet szignifikánsan befolyásolta a rovarölőszer expozíciója. A kezelt állatok $58 \pm 12\%$ -kal kevesebb mozdulatlansági időt produkáltak a kísérlet során, mint a kontroll egyedek ($p < 0,05$ kétmintás t-teszt).

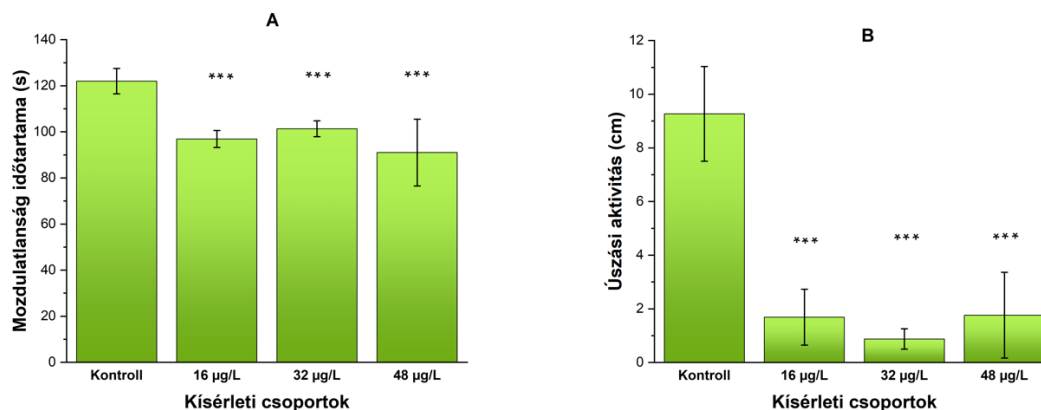
Látható, hogy a szer hatására az állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek mozdulatlanul, azaz lényegesen többet mozogtak, mint a kontrollcsoportban lévő társaik. Ez a mozdulatlanság több tényezőtől adódhat. Egyrészt az úszási tevékenységből – ezért kerül a későbbiekben már a mozgás ezen aktív formája is elemzésre – másrészt a zavart, rendellenes viselkedést tanúsító állat szabálytalan mozgásformái is ide sorolhatók. Az APACS 50 WG a tesztállatra igen agresszíven ható szer, mivel már néhány ng/L-es koncentráció (környezeti koncentráció alsó határa ~ 4 ng/l) pár óra kitettség alatt is képes előidézni olyan változásokat, melyek egyéb káros környezeti tényezővel társulva az állat fiziológiai állapotának romlásához, táplálkozási- és szaporodási viselkedésformáinak abnormalis lefolyásához vezethetnek, súlyosbodhatnak, végső esetben az állat elpusztulásához vezethetnek. Előzetes eredményeink alapján indokolt ng/l koncentrációban vizsgálni a szerhatást, hiszen már 100 ng/l felett 24 órán belül is olyan nagymértékű mortalitás következik be a kezelt csoportban, hogy a szerhatás kiértékelése statisztikailag irrelevánsá válik (9. táblázat).

Exponált anyag	Koncentráció (ng/l)	Kezelt egyedszám	Halott egyedszám	Kezelési idő
APACS 50 WG	Kontroll	10	0	24 h
	50		3	
	100		7	
	150		9	
	250		10	

11. táblázat: Az Apacs 50 WG rovarölőszer igen agresszív mérég a *Dikergammarus villosus* számára

A rendellenes mozgásformák megfigyelése azért fontos, mert háttérükben valószínűsíthetően idegrendszeri zavarok állhatnak, ami előrevetíti azt is, hogy miért érdemes figyelemmel kísérni bizonyos enzimikus változásokat is.

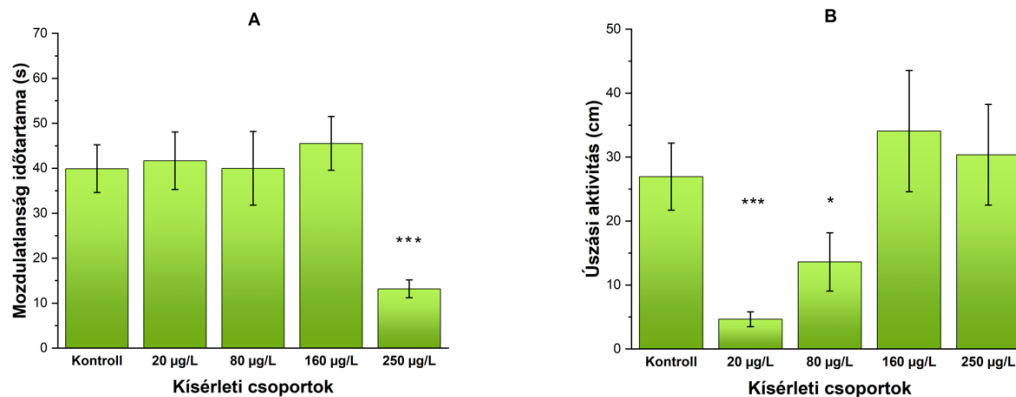
A tiszta KLO expozíciónak mozgásszervi aktivitásra vonatkozó eredményeit mutatja be a **10. ábra**.



10. ábra: A tiszta KLO hatása a *Dikergammarus villosus* mozgási aktivitására 48 óra kezelési idő alatt – mozdulatlanság időtartama (A) és úszásaktivitása (B). Mindegyik oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum) jelzi. A kontrollhoz képest mindkét vizsgált viselkedési forma tekintetében szignifikáns gátlás figyelhető meg valamennyi kezelt csoportban (p < 0,001, egyutas ANOVA).

A mozdulatlanság időtartama szignifikánsan csökkent minden kezelt csoportban (16, 32, 48 $\mu\text{g/L}$) a kontrollhoz képest (10/A ábra). Az állatok úszás-vizsgálatakor az egyedek által a mérési idő alatt megtett távolságot elemezve megállapítható, hogy a kezelt állatok (16, 32, 48 $\mu\text{g/L}$) szignifikánsan rövidebb távokat voltak képesek úszni, mint kontroll társaik (10/B ábra). Ez a motoros funkciók gátlásának következménye. Az állatok rendkívül zavart viselkedést tanúsítottak, szabálytalan mozdulatokat végeztek. A kontroll csoporthoz képest szignifikánsan redukált úszásaktivitással rendelkeztek. Egyéb kísérleti megfigyelés a kopulációra való hajlam fokozódása is. A KLO hatóanyaggal kapcsolatosan kijelenthető, hogy kis kezelési koncentrációnál stresszregeneratív hatással bír, majd az LC_{50} koncentrációnál (80 $\mu\text{g/l}$) töményebb oldatban bekövetkezik a blokkoló, bénító hatás, abnormális pozíciófelvétel (pl: háton fekvés), ha még töményebb oldatoknak tesszük ki az állatokat, akkor az már élettani szempontból abszolút végzetesnek tekinthető (a környezeti koncentráció néhány $\mu\text{g/l}$). A kopulációs és testtartásra vonatkozó elváltozások megfigyelése kísérleti empirikus tapasztalatok alapján kerültek megállapításra, nem mért, számított módszerrel lettek meghatározva. Ezen jellemzők leírását érdekességként, plusz információként kívánom közölni a reprodukálhatóság jegyében.

Az IMI-expozíció viselkedés-befolyásoló hatása látható a **11. ábrán**.



11. ábra: A tiszta IMI hatása a *Dikerogammarus villosus* mozgási aktivitására 48 óra kezelési idő alatt – mozdulatlanság időtartama (A) és úszási aktivitása (B). Mindegyik oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum) jelzi. A kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent a mozdulatlanság időtartama a 250 µg/L-es kezelt csoportban (p <0,001) (A), míg a 20 (p <0,001) és 80 µg/l(p <0,05) kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent az úszási aktivitás (B) egyutas ANOVA).

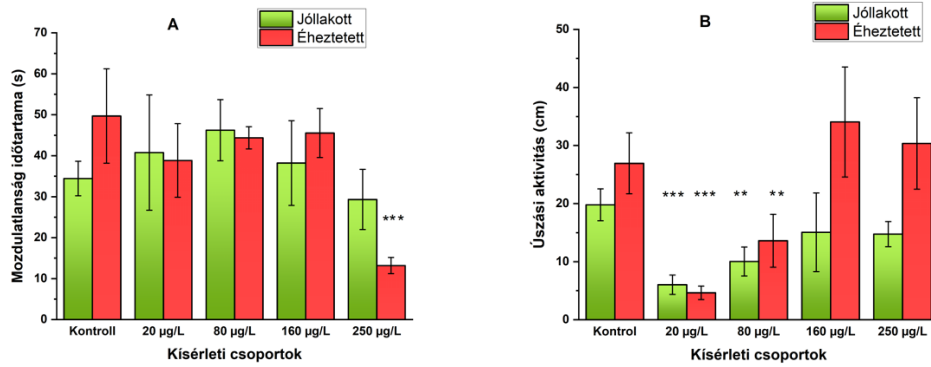
A kontrollhoz képest csak a 250 µg/l koncentráció csökkentette szignifikánsan a mozdulatlanság időtartamát a kontroll csoporthoz viszonyítva (11/A. ábra). Az úszási aktivitás vizsgálatokor azzal szembesülhetünk, hogy a 20 és a 80 µg/lkezelési koncentrációk esetében lépett fel szignifikáns szerhatás a kontrollhoz képest (11/B. ábra). E két vizsgált végpont tekintetében más-más nagyságrendű kezelési koncentrációk esetén tapasztaltunk szignifikáns változást a viselkedésben. Megfigyeléseink alapján az IMI viselkedésre gyakorolt hatása kis kezelési koncentrációnál is megmutatkozik ugyan, mégsem eredményez a kezelt csoporton belül oly mértékű halálozási rátát és elváltozásokat, mint a KLO. 200 µg/l koncentráció felett figyeltünk meg egyéb kísérleti tapasztalatként a KLO-nál is látott rendellenes testtartást és mozgásformákat pl.: háton fekvés, gömbölyded forma felvétele, de totális mortalitás 200 µg/l koncentráció felett nem fordul elő, a kopulációra való hajlam felerősödése nem jellemző olyan mértékben, mint a KLO-nál. Laboratóriumi körülmények között olyan mértékű toxicitáskülönbséget tapasztaltunk a két vegyület között, hogy érdekessé válik az a tény, miszerint

szántóföldi használatát mindkettőnek egy 2018-ban kiadott EPA és EFSA határozat tiltotta be (Valavanidis, 2018). A kapott eredmények azt sugallják, hogy az IMI toxicitása laboratóriumi körülmények között alacsonyabb, mint a KLO hatóanyagé (12. táblázat). Azonban az IMI a legnagyobb mennyiségben kijuttatott neonikotinoid és emiatt kijuttatásának környezeti kockázata igen jelentős, mert környezeti koncentrációja elérheti a több száz $\mu\text{g/l}$ -t is.

		Exponált anyag		
		IMI	KLO	
Koncentráció ($\mu\text{g/l}$)	Kezelt egyedszám	Halott egyedszám	Halott egyedszám	Kezelési idő
Kontroll	10	2	0	48 h
16		0	0	
32		0	4	
48		0	5	
64		1	10	
80		1	9	

12. táblázat: A tiszta KLO magasabb mortalitást okoz a kezelt csoportokban, mint a tiszta IMI.

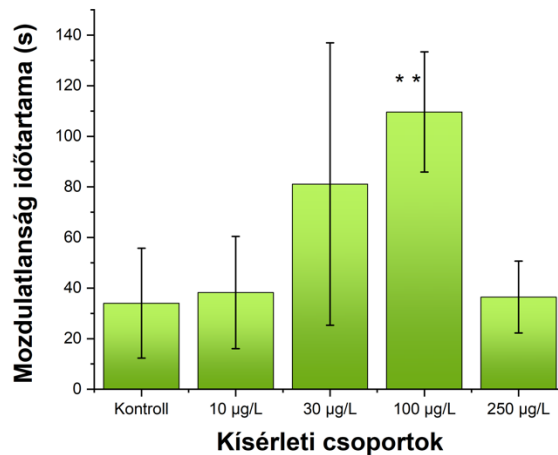
Mindezeken túlmenően a sárgarépával történő etetés kapcsán felmerült, a táplálék esetleges mérgezést kivédő hatása, tehát az a jelenség, hogy a sárgarépa β -karotin tartalma antioxidáns hatást fejt ki az állatban, ezáltal a méreganyagok - jelen esetben a rovarölő szerek – által okozott és megfigyelt fiziológiás elváltozások nem tükrözik a mérgezés tényleges mértékét. Ennek kiderítésére végeztünk ad libitum etetett állapokra vonatkozó vizsgálatokat, melyek keretében a kísérletek előtt szokásos módon két napig éheztetett csoportok mellett alkalmaztunk a kísérletek előtt folyamatosan táplált csoportokat is (**12. ábra**).



12. ábra: A tiszta IMI hatása a *Dikerogammarus villosus* mozgási aktivitására a jóllakottsági állapottól függően 48 óra kezelési idő alatt - mozdulatlanság időtartama (A) és úszási aktivitása (B). Mindegyik oszlop az átlag \pm SD ($n = 10$ állat/csoport/replikátum) jelzi. Az ábra tanúsága szerint az IMI csak a kontroll csoporthoz képest váltott ki szignifikáns gátló hatást a mozdulatlanság időtartamát tekintve az éheztetett 250 $\mu\text{g/l}$ kezelt csoportban, valamint az úszási aktivitásra vonatkozóan a 20 $\mu\text{g/l}$ és 80 $\mu\text{g/l}$ kezelt csoportokban. $p < 0.001$; $p < 0.001$ és $p < 0.01$, egyutas ANOVA.

A vizsgálat eredményeképpen azt kaptuk, hogy a jóllakottsági állapotok kezelt- és kontrollcsoportjai között fedezhető fel szignifikáns különbség, bár a mozdulatlansági időtartam végpontra vonatkozóan a legnagyobb koncentráció tekintetében az éheztetett csoport szignifikanciát mutat a kontrollhoz képest, míg a jóllakott csoportnál ezt nem látjuk. A kezelt csoportokat egymáshoz viszonyítva inszignifikancia jellemzi. Ez azt jelenti, hogy bátran bevethető a sárgarépa, mint táplálék még az ökotoxikológiai tesztek során is amennyiben a klasszikus eledelket - mint az alga, haltáp – az állat fogságban nem fogyasztja (mint esetünkben). Ez azt jelenti, hogy bátran bevethető a sárgarépa, mint táplálék még az ökotoxikológiai tesztek során is amennyiben a klasszikus eledelket - mint az alga, haltáp – az állat fogságban nem fogyasztja (mint esetünkben). Ha az említett helyzet állna fenn és mégis fenntartásaik lennének a kutatótársaknak a sárgarépa táplálékként történő alkalmazását illetően, akkor megfelelő táplálék lehet még a burgonya (*Solanum tuberosum*) is. A lényeg, hogy olyan növényt válasszunk, amely nem úszik a víz felszínén. Ennek egyszerű oka az, hogy az alámerült, illetve lebegő táplálékhoz az állatok a rejtőzködő, illetve úszó tevékenységek közben férnek hozzá a növényekhez és a *Dikerogammarus* nem úszik a víz felszínének közelében.

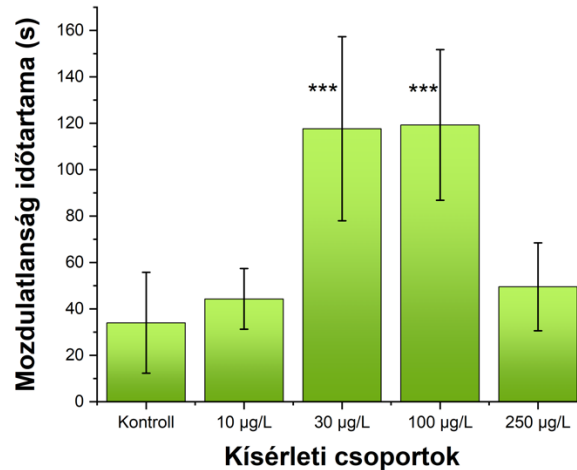
A TIAK neonikotinoid tiszta formájának is elvégeztük a hatásvizsgálatát a kétpúpós bolharák balatoni egyedein a viselkedés vonatkozásában (13. ábra).



13. ábra: A tiszta TIAK hatása 48 óra időtartamú kísérletekben a *Dikerogammarus villosus* úszásaktivitására. Minden oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum) jelzi. A kontrollhoz viszonyított szignifikancia (p < 0,01, egyutas ANOVA) 100 µg/l kezelési koncentrációnál figyelhető meg.

A mozdulatlansági időtartam, mint vizsgált végpont alapján megállapítható, hogy 100 µg/l kezelési koncentrációnál a kontrollhoz képest szignifikáns különbség következett be. A kezelt példányok az említett koncentrációig fokozódó inaktivitással jellemezhetőek. A legtöményebb oldattal kezelt csoport (környezeti koncentrációnál három nagyságrenddel töményebb) a kontroll egyedekhez mérhető emelkedett aktivitást mutatott. Tehát a kevésbé tömény médiumok (~ környezeti koncentrációk: meghaladhatják az 1 µg/l-t is) esetén fellépő hatás miatt 2020-ban ezt a vegyületet is betiltották az EU-ban. A megfigyelt az egyed szintű megváltozott viselkedésformák következtében társas viselkedési zavarok léptek fel, ami hosszútávon populációs szinten az egyensúly felborulását eredményezheti. A kezelése során alkalmazott legtöményebb oldat valószínűleg a fokozódó méregtelenítés miatt nem okozott komolyabb károsodást. Kismértékű, inszignifikáns letalitás következett be a kezelt csoportban.

A TIAK hatóanyagot tartalmazó Calypso® 480 SC kereskedelemben 2020-ig kapható rovarölőszer által a *D. villosus* úszásaktivitására kifejtett hatása (14. ábra) a tiszta szerhez hasonló alakzatú görbéket eredményezett azzal az eltéréssel, hogy már 30 µg/l koncentrációnál szignifikáns változás állt be az egyedek viselkedésében, amely 100 µg/L-ig mutatkozott.



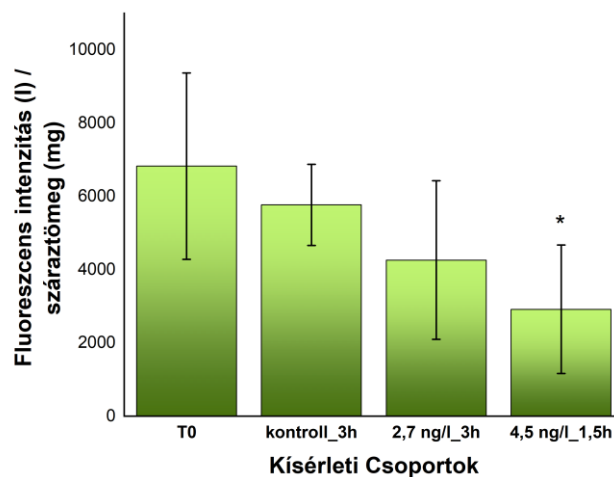
14. ábra: *Dikerogammarus villosus* Calypso® 480 SC TIAK tartalmú inszekticid expozíciójának hatása 48 óra időtartamú kezelés után. Már 30 µg/l TIAK hatóanyag-koncentráció is előidézt a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ($p < 0,001$) aktivitás-csökkenést, ez az állapot fennmaradt 100 µg/l TIAK-koncentrációnál is, minden oszlop az átlagot \pm SD ($n = 10$ állat/csoport/replikátum, egyutas ANOVA).

Ennél töményebb oldatban a formázott szernél is tapasztalható, hogy az úszásaktivitás megközelíti a kontrollcsoport egyedeinél látottakat, vagyis az egyedek élénk mozgását, mivel a méregtelenítés hatékonyan működött.

V/2. A Neonikotinoid-nak kitett *Dikerogammarus villosus* biokémiai változásai

Az enzimatisz vizsgálatok első lépéseként megvizsgáltuk a tesztállat egyedein az elsőfokú detoxifikációs folyamatként ismert biomarker, a multixenobiotikus rezisztencia mechanizmus

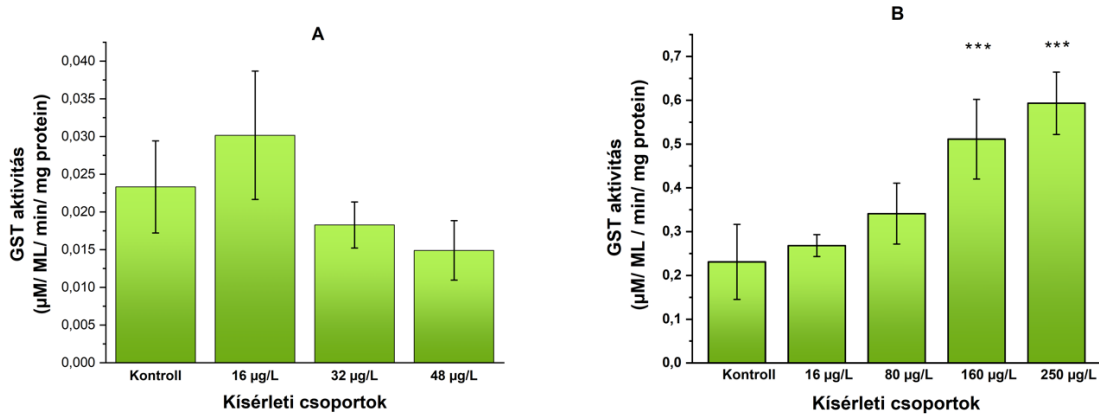
(MXR) működését (**15. ábra**). Nemcsak kezelt és kontroll csoportot alkalmaztunk, hanem egy Time zero-nak elnevezett (T_0) egyedegyüttest is. Ez utóbbi a nulladik időpillanatban (az expozíciós idő leteltével) az állatok szöveteiben felhalmozódott festékmennyiséget hivatott mutatni. Ennek azért van jelentősége, mert a kontroll csoport egyedek szövetéből a kísérlet időtartama alatt az őket körülvevő balatonvízbe diffundált a festék mérhető mennyisége, így T_0 csoport nélkül nehéz pontosan meghatározni, valójában mennyi festéket vett fel az állat.



15. ábra: APACS 50 WG (2,7 ng/l és 4,5 ng/l 3, illetve 1,5 órás kezelés hatása a rodamin-b felhalmozódására *Dikergammarus villosus* testállatban. A fluoreszcencia adatok $58 \pm 32\%$ -kal csökkent rodamin-b szintet mutatnak a szöveti koncentrációk esetén a T_0 csoporthoz képest ($p < 0,05$, egyutas ANOVA).

Az ábrán látható, hogy a T_0 és a mindössze 4,5 ng/l töménységű Apacs 50 WG balatonvizes oldatban inkubált csoport között szignifikáns különbség áll fent. Az Apacs 50WG rovarölő szer fokozza az MXR aktivitást, kemostimuláló hatást gyakorol az állatra. A formázószerek és a hatóanyag (KLO) szervezetből történő kiürítése már másfél órás expozíció alatt is nagy hatásokkal zajlik.

A KLO és az IMI biokémiai hatásvizsgálatainak részeként mértük a GST enzim aktivitását tiszta anyagformák exponálásakor azért, hogy kiderítsük e kétfajta Neonikotinoid hatóanyag milyen hatást gyakorol a méregtelenítés II. fázisában (elsődleges metabolitokból konjugátumképzés) aktiválódó GST-re (16. ábra).



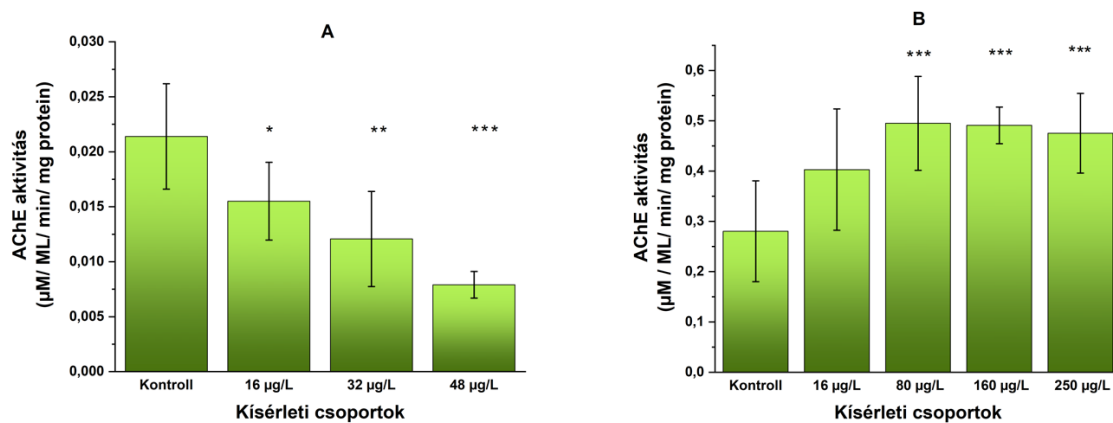
16. ábra: GST enzimaktivitás változása *Dikergammarus villosus* egyedek 48 órás tiszta KLO (A) és IMI (B) kezelését követően. Minden oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum) jelzi. Nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a KLO-val kezelt csoportok között (A). A kontrollhoz képest szignifikánsan megnövekedett GST aktivitást mutatott a 160 és a 250 µg/L IMI-kezelt csoport (n = 10 egyed/csoport/replikátum (p < 0.001, egyutas ANOVA).

Látható, hogy KLO hatására a GST aktivitás változásában nincs szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest a koncentráció emelésével aktivitás csökkenés figyelhető meg inszignifikáns mértékben (16/A ábra). A viselkedésvizsgálatok alapján következtethetünk arra, hogy a KLO igen agresszív mérgező a *Dikergammarus*ok számára, viszont enzimatikus folyamatokban csak az I. fokú méregtelenítést aktiválja. Ennek okai lehetnek, hogy az MXR eliminálta a KLO-t.

Az IMI-expozíciót követő GST-mérések azt mutatták, hogy ez a szer csak magasabb koncentráció-tartományban képes szignifikáns hatást gyakorolni az enzimaktivitásra (16/B). Ez igazolta korábbi viselkedés-vizsgálatokon alapuló megfigyeléseinket, miszerint az IMI nem tekinthető olyan erős mérgezőnek, mint a KLO, mert azonos élettani hatásokat csak egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban képes kiváltani. A KLO-t azért nem tudtuk az IMI-

vel azonos koncentrációtartományban tesztelni enzimaktivitásra, mert ekkor a KLO-val kezelt csoportokban teljes mortalitás következett be. Az IMI és a KLO esetében a klór szubsztituenseket részben kiszorítja a glutation (GSH), ami végül jól azonosítható konjugátumokat képez.

Az AChE enzimvizsgálatot elsősorban azért tartottuk fontosnak, mert az eddigi kutatások azt támasztják alá, hogy a neonikotinoidok elsődleges támadáspontjai a kolinerg receptorok és az AChE is részt vesz a kolinerg rendszer működésében. Ennél fogva erősen feltételezhető, hogy az AChE működésére, aktivitására hatással van a neonikotinoid expozíció (17. ábra).

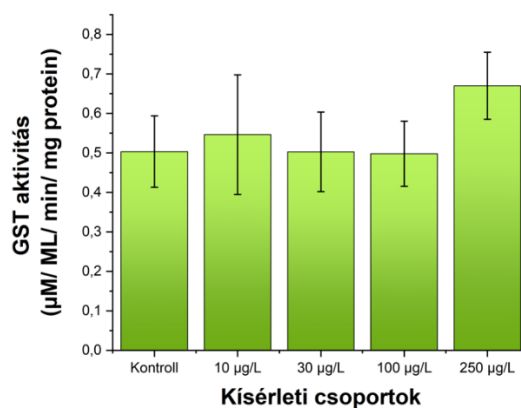


17. ábra: Az AChE enzimaktivitás változása a *Dikerogammarus villosus* tesztállatban a KLO (A) és az IMI (B) kezeléseket követően. Minden oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum) jelzi. A kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent AChE aktivitás volt megfigyelhető a 16 µg/l (p < 0,05), 32 µg/l (p < 0,01) és 48 µg/l (p < 0,001) töménységű KLO-val kezelt csoportokban (A). Ezzel szemben szignifikánsan megnövekedett AChE aktivitást mértünk a 80 µg/L, 160 µg/L, 250 µg/L IMI-t tartalmazó oldatokkal kezelt csoportokban (B), n = 10 egyed/csoport/replikátum, egyutas ANOVA).

A KLO már egész alacsony (környezeti) koncentrációban is képes szignifikáns enzimaktivitás csökkenést előidézni, csökkentve az acetilkolin ingerületvezető neurotranszmitter lebomlási sebességét, ezáltal elősegítve annak felhalmozódását a szervezetben, ami azért veszélyes, mert az állat halálát okozhatja (17/A). Ezért csak az ábrán látható koncentrációtartományt tudtuk vizsgálni. Ugyanakkor megállapítható, hogy az AChE aktivitás gátlása nem a KLO nACh-ra

gyakorolt közvetlen hatásának a következménye, hanem a szervezet általános károsodott fiziológiás állapotát tükröző közvetett hatás, amely a neonikotinoid koncentráció növekedésének is a függvénye. Az IMI-t tartalmazó balatonvíz AChE enzimaktivitásra gyakorolt hatását szemléltető ábrán (17/B), látható, hogy a szignifikáns változások megjelenése ötször nagyobb exponált koncentrációnál jelentek meg, mint a KLO esetében. Azonos szignifikanciaszinten közel kétszer nagyobb töménységű IMI oldat volt képes kiváltani hasonló mértékű változásokat a kontroll csoporthoz képest. Az IMI viszont nem blokkoló, hanem serkentő hatású az AChE-aktivitásra. Így az ACh bomlásának fokozódását idézi elő, neurális zavarokat okozva, melyek a viselkedésben manifesztálódnak.

A tiszta TIAK Neonikotinoid GST enzimaktivitásra gyakorolt hatását is vizsgáltuk két napos kezelések során *D. villosus* egyedeken (18. ábra).

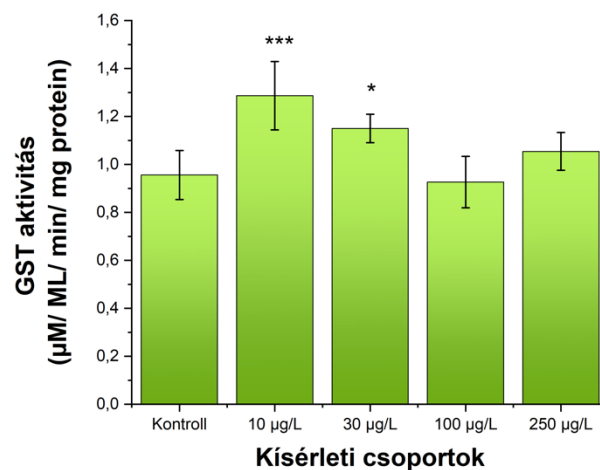


18. ábra: A tiszta TIAK hatása a *Dikerogammarus villosus* GST enzim aktivitására 48 óra kezelési idő után. Látható, hogy a kísérleti időintervallumban a kezelés nem eredményezett szignifikáns változásokat a kezelt egyedeken. Minden oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum, egyutas ANOVA) jelzi.

Az eredmények nem mutatnak szignifikáns eltéréseket a kontrollcsoporthoz képest egyik kezelt csoportban sem. A legnagyobb kezelési koncentráció - amely megegyezik az IMI kezeléseket

maximális kezelési koncentrációjával - kismértékű, de nem szignifikáns GST enzimaktivitást jelez, míg az IMI ebben a koncentráció-tartományban szignifikáns változásokat váltott ki.

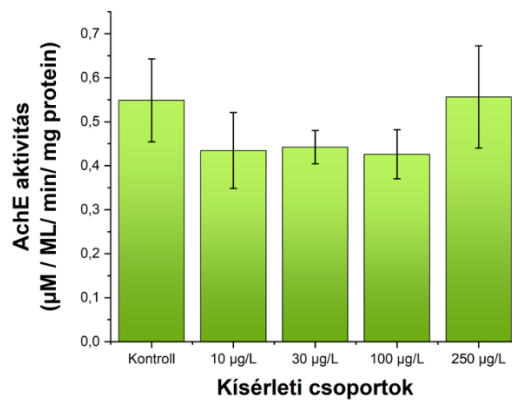
A Calypso 480 SC formázott, TIAK aktív hatóanyagot tartalmazó szer hatása (**19. ábra**) a tiszta formával ellentétben már a legkisebb kezelési koncentrációnál szignifikánsan megnövelte a GST enzimaktivitást a kontroll egyedekhez képest.



19. ábra: Calypso® 480 SC rovarölőszer-kezelés hatása *Dikerogammarus villosus* testállatra. 48 óra expozíciós idő alatt a hígabb oldatok esetén szignifikáns ($p < 0,001$; 10 µg/L, $p < 0,05$; 30 µg/L) enzimaktivitás-emelkedés tapasztalható a kontroll csoporthoz képest. Minden oszlop az átlag \pm SD ($n = 10$ állat/csoport/replikátum, egyutas ANOVA) jelzi.

Növelve a TIAK-terhelést megfigyelhető a kezdeti szignifikancia csökkenése, a legmagasabb koncentrációjú terhelések (100 µg/l, 250 µg/L) esetében pedig megközelítette a kontroll példányok enzimaktivitását. A detoxifikáció sikeresnek mondható a toxikusabb, formázott vegyület esetében is.

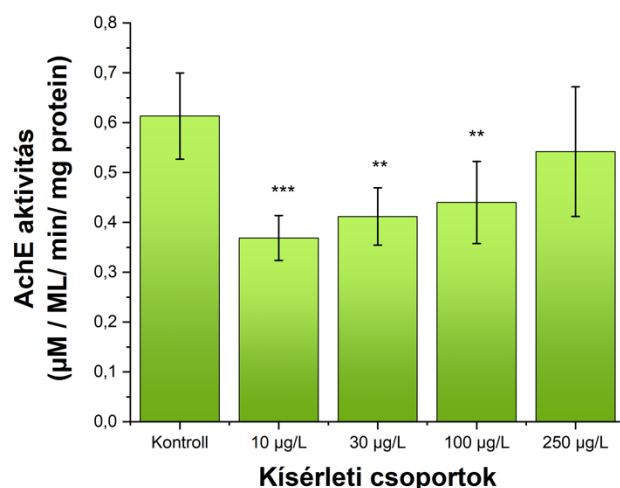
A tiszta TIAK ingerületvezetésre gyakorolt hatását (**20. ábra**) vizsgálva



20. ábra: A tiszta TIAK hatása az AchE enzimaktivitásra a *Dikerogammarus villosus* 48 óra időtartamú kezelését követően. A GST-hez hasonlóan az AchE aktivitásban sem következett be szignifikáns változás egyik kezelt csoport egyedeiben sem a kontroll példányokhoz képest. Minden oszlop az átlag \pm SD (n = 10 állat/csoport/replikátum, egyutas ANOVA) jelzi.

Azt tapasztaltuk, hogy a kontrollcsoporthoz viszonyítva nem következett be szignifikáns változás, az AChE enzimaktivitás csökkenése jellemző. A legnagyobb exponált koncentráció a kontrollhoz hasonló enzimaktivitást váltott ki. Látható, hogy a TIAK a KLO-hoz hasonló módon befolyásolta az ingerületvezetést (a legnagyobb kezelési koncentrációt kivéve), de mivel EC_{50} toxicitásában több nagyságrenddel elmarad a KLO-tól, így szignifikáns eltéréseket nem mutat. Az alacsonyabb kezelési koncentrációk esetén az AChE aktivitás viszonylag egyenletesen csökkent szintet mutat, míg az úszásaktivitás egyre csökken, azaz csökkenő enzimaktivitás redukált mozgásformákat eredményez. Viszont mindkét végpontra jellemző, hogy a legnagyobb terhelés hatására a kontrollhoz hasonló szintre áll be.

A Calypso 480 SC által kiváltott AChE enzimaktivitás-változás (**21. ábra**) lefolyása hasonló a tiszta formánál látottakkal, azzal az eltéréssel, hogy ebben az esetben szignifikáns csökkenés következik be alacsonyabb terhelésen.



21. ábra: Calypso® 480 SC 48 órás rovarölőszer-kezelés hatása a *Dikerogammarus villosus* AchE enzimaktivitására. Az AchE vizsgálatokor megfigyelhető az alacsonyabb TIAK koncentráció által kiváltott szignifikáns aktivitáscsökkenés a kontrollhoz képest ($p < 0,001$; 10 µg/L, $p < 0,01$; 30 µg/L és 100 µg/L). Minden oszlop az átlag \pm SD ($n = 10$ állat/csoport/replikátum, egyutas ANOVA) jelzi.

A legnagyobb kezelési koncentráció a kontrollhoz hasonló aktivitást mutatott itt is. A mozgásaktivásban is elnyújtott szignifikanciát eredményező Calypso 480 SC az ingerületvezetést is markánsabban befolyásolta, mint a tiszta forma. Mindkét esetben U-alakú enzimgátlás figyelhető meg. Kijelenthető azonban, hogy a TIAK mérgező hatása elmarad mind a KLO, mind az IMI által előidézett változásoktól.

VI. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen kutatásunkban viselkedési, valamint biokémiai vizsgálatokat végeztünk a mozdulatlansági idő, az úszási aktivitás, a GST és AChE aktivitás végpontok változásainak kimutatására akut KLO, IMI és TIAK tiszta hatóanyagok, valamint Apacs 50 WG és Calypso 480 SC formázott szerek expozícióját követően. A viselkedési tesztek, mint például a lokomotoros aktivitás, érzékenyek és specifikusak a neurotoxikus hatások kimutatására, mivel a viselkedésben bekövetkezett változás várhatóan közvetlenül vagy közvetve az idegrendszer működéséhez kapcsolódik. A *D. villosus* vizsgált rákfaj egyedein tesztelt neonikotinoidok expozíciója által bekövetkező viselkedésbeli változások nyomonkövetése azért szükséges, mert nem csupán egyedi viselkedésformák megváltozását figyelhetjük meg, hanem az egyedek egymás közti, társas interakcióinak megváltozását is szemügyre vehetjük, továbbá a viselkedésformák megszokottól eltérő megnyilvánulása a környezeti stresszoroknak való kitettség potenciális biomarkere (Wallace and Estephan, 2004; Consolandi és mtsai., 2019). Ilyen pl. a szokatlan testhelyzetek felvétele (hátonfekvés), valamint a kopulációs és kannibalista hajlam felerősödése (Englert és mtsai., 2012).

A kísérleteket azért végeztük szüretlen médiában, mert ily módon realisabb képet kaphatunk a tesztorganizmusokra gyakorolt hatásokat illetően. Ezt azért gondoljuk így, mert - bár ezidáig a szakirodalom nem szolgáltatott bizonyítékot neonikotinoidek jelenlétére a Balaton vonatkozásában, ha ez bekövetkezne, akkor - a szermaradványok az élőlények természetes közegével reagálnak. Ezeket a reakciókat a vízben oldott és lebegő anyagok nagymértékben képesek befolyásolni, megváltoztatva a vegyszerek toxikológiai hatásait.

A xenobiotikumok (pl: peszticidek) szervezetre gyakorolt legjelentősebb hatásai: neurofiziológiai, viselkedési és szaporodási. Ezek a hatások néha összefüggenek egymással, mivel a neurológiai változások befolyásolhatják a viselkedést, a viselkedésbeli változások pedig hatással lehetnek a reprodukcióra, erről számol be C.H Walker a *Principles of Ecotoxicology* című könyvének első fejezetében (Walker és mtsai., 2012a).

A KLO-kezelés eredményeként a *D. villosus* példányok úszási aktivitása csökkent, és az állatok kevesebb időt töltöttek nyugalmi állapotban, ami B típusú válaszreakcióra utal. Ezzel szemben a KLO-alapú Apacs 50 WG rövid távú alkalmazása A-típusú választ okozott (Somogyvári és mtsai., 2020). B-típusú választ írtak le amerikai csótányoknál is KLO-kezelést követően, az állatok lassan mozdulatlanokká váltak, testtartásuk megváltozott, és szinte mindegyikük megbénult (Tan és mtsai., 2007b). A neonikotinoidek bár agonista hatással bírnak az AChE receptorokhoz való kötődés során, ez az agonizmus szerkezettől függő hatásfokkal bír. Az aciklikus elektronnegatív farmakofór csoportok jelenléte biztosítja a nagy hatásfokú agonizmust. Mindez azért fontos, mert az agonista jelleg erőssége meghatározza az adott szer rovarölő aktivitását, vagyis azt, hogy adott számú rovar elpusztításához mekkora mennyiségű szert kell felhasználni. A kisebb hatásfokú vegyületek serkentő hatást gyakorolnak a kezelt egyedekre (A-típusú válaszreakció), míg a nagyobb hatásfokú agonizmussal bíró vegyületek depresszív, paralitikus tünetegyütteseket idéznek elő a kísérleti alanyok viselkedésében (B-típusú válaszreakció). Egy másik vizsgálat kimutatta, hogy a KLO 1 órás alkalmazását

követően jelentősen csökkent a lokomotoros aktivitást mutató csótányok aránya, és ez a hatás függött a KLO beadásának módjától (a hemolimfába vagy más módon) és az alkalmazott koncentrációtól (Benzidane és mtsai., 2010b). A mi vizsgálataink kimutatták, hogy az IMI expozíció sokkal magasabb koncentrációban ugyan, de szintén hasonló hatást vált ki a *D. villosus*-on kissé eltérő viselkedési mozgásokkal. A TIAK és a Calypso esetében 100 µg/l TIAK kezelési koncentrációnál szignifikáns különbség mutatkozott a kontrollhoz képest. A kezelt egyedeket ezen koncentráció eléréséig egyre növekvő inaktivitás jellemezte. A legtöményebb oldattal (250 µg/l) kezelt csoport a kontrollcsoportéhoz hasonló aktivitást mutatott. A Calypso a tiszta szerhez hasonló hatásokat okozott. Azonban már 30 µg/l Calypso-koncentrációban is szignifikáns változás mutatkozott az egyedek mozdulatlansági idejében, amely 100 µg/l Calypso esetében is szignifikáns volt. Emellett a legtöményebb alkalmazott oldatban (250 µg/L) a kereskedelmi forgalomban alkalmazott neonikotinoid-készítmény a kontroll csoportéhoz hasonló úszási aktivitást mutatott, azaz az egyedek élénk mozgást mutattak, ugyanúgy, mint a tiszta hatóanyag esetében. A TIAK hatását zebradánió-lárvákön (*Danio rerio*) is vizsgálták a spontán farokmozgás aktivitás, mint végpont tekintetében. Eredményül kapták, hogy a faroktekeréselek száma csökkent (Von Hellfeld és mtsai., 2022; (von Wyl és mtsai., 2023). Az izmok integritását a zebradánió lárvák esetében a TIAK befolyásolja (Sarah Könemann, Melissa von Wyl, 2022).

Az MXR-aktivitást a kereskedelmi forgalomban kapható, KLO alapú APACS 50 WG rovarölő szer akut hatásának vonatkozásában vizsgáltuk a *D. villosus* mozdulatlansági idejére. Az eredményeket az APACS-kezeléssel és APACS-kezelés nélkül mért rodamin-akkumulációs adatok különbségei alapján értékeltük - mindkettőt a T_0 szinthez hasonlítottuk. Kimutattuk, hogy 3,9 ng/l koncentrációban az APACS csökkentette a mozdulatlansági időt. Méréseink alapján bebizonyosodott, hogy az APACS 50 WG rovarölő szer fokozza az MXR-aktivitást (kemostimuláció). Bár a neonikotinoidok MXR rendszerre gyakorolt hatásáról csak kevés

irodalmi adat áll rendelkezésünkre, izolált kagyló kopoltyúja esetében azt találták, hogy az APACS 50WG az MXR szubsztrátjaként, míg a hosszú távú kezelés esetében kemostimulátorként működött (Vehovszky és mtsai., 2018). Eredményeinkből arra következtetünk, hogy alacsony neonikotinoid-koncentráció mellett a neonikotinoid (és a formázószer) által kiváltott oxidatív stressz károsítja az intracelluláris kompenzációs mechanizmusokat, ami a neonikotinoidok (és a formázószer) által kiváltott toxicitással szembeni fokozott aktivitást eredményez. Az MXR-aktivitás tekintetében a *Dikergammarus* egy nagyságrenddel nagyobb érzékenységet (ng/l) mutatott az APACS 50WG-vel szemben, mint a kagylóknál (Vehovszky és mtsai., 2018).

A szubletális biokémiai hatásokat a GST- és AChE enzimaktivitással mértük. A GST enzim aktivitása fontos szerepet játszik a II. fázisú méregtelenítési folyamatban. A GST katalizálja a szennyező anyagok konjugációját, hogy eltávolítsa azokat a sejtekből, így védve a szöveteket a károsodástól.

A GST enzim aktivitásának jelentős növekedését figyeltük meg a Calypso kezelések után, ami arra utal, hogy a *D. villosus* a GST aktivitás révén képes lehet a Calypso TIAK tartalmának eliminálására. Eredményeink azt mutatták, hogy az alacsonyabb koncentrációknak jelentősebb hatása volt, mint a magasabb koncentrációknak. A GST-aktivitás a 10 és a 100 µg/l Calypsoval kezelt csoportokban nőtt meg. A szignifikánsan megnövekedett GST-aktivitás csak ebben a 2 vizsgált csoportban volt megfigyelhető, de a legmagasabb koncentrációban a GST-aktivitás már nem különbözött szignifikánsan a kontrollcsoportban tapasztaltaktól. A Calypso-expozíció által kiváltott megnövekedett GST-aktivitás a detoxikációs folyamatok aktiválódására utal a kezelt gammaridákban.

Az IMI által kiváltott oxidatív stressz 20 µg/L koncentrációban szintén megnövekedett GST-aktivitást váltott ki a bentikus kagylókban (Shan és mtsai., 2020). A Confidor 200 SL (az IMI egyik kereskedelmi formulája) 24 órás expozícióját követően fokozott GST-aktivitásról

számoltak be a *Gammarus fossarum* ((Koch, 1836)) amfipoda esetében (Malev és mtsai., 2012b). Egy másik vizsgálatban az IMI-t *Folsomia candida* (Willem, 1902) fajon tesztelték, és az IMI megnövelte a GST-aktivitást (Sillapawattana & Schäffer, 2017) . Az IMI környezeti szempontból releváns koncentrációjának 4 napos expozíciót követően a sydney-i sziklaosztriga (*Saccostrea glomerata*; Gould, 1850) hemolimfájában a GST aktivitás jelenősen megnőtt (Ewere és mtsai., 2020). A fekete tigrisrák (*Penaeus monodon*; Fabricius, 1798) szövetében is emelkedett GST-aktivitást mértek a hasüregben és a hepatopancrasban egyaránt (Butcherine és mtsai., 2022b) . A Mospilan csökkentette a GST aktivitást a *D. magna*-ban, amit a szubsztrát késleltetett vagy gátolt oxidációja okozott (Mörthl, Vehovszky, és mtsai., 2020) .

A KLO kezelések után nem találtunk változást a GST szintjében, ami azt jelzi, hogy a *D. villosus* nem képes a KLO-t a GST aktivitás segítségével eliminálni. Ugyanakkor a 160 és 250 µg/L IMI-vel kezelt csoportokban szignifikánsan megnövekedett GST-aktivitást figyeltünk meg. Az eredmények azt jelezték, hogy a magasabb koncentrációknak markánsabb hatása volt az alacsonyabb koncentrációkhoz képest.

A TIAK és KLO biotranszformációjáról tudomásunk szerint nem számoltak be a szakirodalomban, de az IMI négy vizsgált metabolitja közül az IMI-ol könnyen biotranszformálódott az IMI kiindulási hatóanyagból (Huang és mtsai., 2021) . Mint ismeretes, a piridinil (A1) klór-szubsztituenseket részben kiszorítja a glutation (Casida, 2011) ,ami arra utal, hogy a GSH a kulcsa az IMI által okozott fokozott GST-aktivitásnak (Somogyvári és mtsai., 2022) . Valószínű, hogy a magasabb kezelési koncentrációknál (100 µg/L felett) a szabad GSH már a 2 napos kezelés során elfogyott. A GSH fogyása/eltűnése a kezelés során a konjugátképzés lassulásához vezethetett. Ezért a kezelési időszak végére a GSH hiányában a GSH aktivitása már nem változott meg. Ezt megerősítették azok a vizsgálatok, amelyekben a GST-aktivitás mértéke a neonicotinoid-expozíció időtartamától függött (Radwan & Mohamed, 2013; Stara és mtsai., 2021).

Biokémiai szinten vizsgáltuk az AChE enzimaktivitás változásait a IMI, KLO, TIAK és a Calypso hatására. A más peszticidekre vonatkozó korábbi megfigyelésekkel ellentétben a neonikotinoidok nem gátolják közvetlenül az AChE aktivitást. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy az ACh-val ellentétben a neonikotinoidok nem hidrolizálódnak az AChE enzim révén. Másrészt egyre több bizonyíték van arra, hogy az AChE a neonikotinoidok potenciális célpontja, mivel különböző fajok rovarölőszerezrel kezelt állatainak szöveteiben megváltozott AChE-aktivitásról számoltak be (Boily és mtsai., 2013; Sarah Könemann, Melissa von Wyl, 2022). Mindemellett azt sem zárhatjuk ki, hogy az AChE közvetlenül is kölcsönhatásba léphet a neonikotinoidokkal.

A TIAK és a Calypso *D. villosus*-ra gyakorolt lehetséges közvetett hatásainak vizsgálatakor megfigyeltük, hogy az AChE enzim aktivitása szignifikánsan csökkent a kereskedelmi készítmény alkalmazása után minden alkalmazott koncentrációnál. Az AChE-aktivitás változását azonban nem találtuk szignifikánsnak a tiszta hatóanyag esetében, de mindkét esetben U alakú enzimgátlást figyeltünk meg a koncentráció függvényében.

KLO exponálásakor azt találtuk, hogy az AChE aktivitása szignifikánsan csökkent minden kezelt csoportban. Továbbá szintén szignifikáns enzimaktivitás-emelkedést mutatott az IMI-vel kezelt 80 µg/L, 160 µg/L és 250 µg/L csoport is.

Az irodalomban kevés adat áll rendelkezésre a TIAK és a KLO kolinerg rendszerre, különösen az AChE-aktivításra gyakorolt hatásairól. Az IMI az AChE-aktivitás U-alakú gátlását idézte elő a kagyló kopoltyúiban a magasabb koncentráció-tartományokban. Másrészt a TIAK ugyanebben a vizsgálatban fokozott aktivitást mutatott (Dondero és mtsai., 2010) . A legnagyobb alkalmazott 10 mg/kg Calypso koncentráció az AChE aktivitás csökkenését okozta földigilisztán, és 1 mg/kg szintén csökkenést okozott ugyanebben a vizsgálatban (Lackmann és mtsai., 2023) . A nem célzott vízi szervezetek esetében az IMI-expozíciót követően csökkent AChE-aktivitásról számoltak be garnélarákok (Butcherine és mtsai., 2022b) , osztrigák (Ewere

és mtsai., 2019) és zebra danióak (Guerra és mtsai., 2021) esetében. A vízi szervezetek esetében a neurotoxikus szerek miatt megnövekedett AchE-aktivitás nem szokványos következmény (Tian és mtsai., 2018). Ismereteink szerint rajtuk kívül csak 2 vizsgálat mutatta ki méheken, hogy az IMI megnövelte az AChE aktivitását neonikotinoid kezelések hatására. Az IMI erős kötődése az ACh receptorokhoz a kolinerg neuronok folyamatos aktiválódását eredményezte, amit hajlamos kompenzálni a megnövekedett AchE-szint, mindez pedig hasi görcsöket és a normális bélműködés zavarát okozta (Pervez & Manzoor, 2021). A neonikotinoidokkal való félmezős és szabadföldi expozíciót követően a méhek fokozott AChE-aktivitását jelezték, és ez a méhek túlélésének csökkenésével járt együtt (Boily és mtsai., 2013). Eredményeinkből kiderül, hogy a TIAK, a KLO és az IMI is neurotoxikus a *D. villosus* számára az AChE aktivitás gátlásának, IMI esetében növelésének elősegítésével. A viselkedésben bekövetkezett változások szintén összefüggésbe hozhatók az AChE-aktivitásban megfigyelt változásokkal. A neuronális elváltozásokat okozó egyéb sejtes/neuronális változások ellenére azonban más biokémiai folyamatok is szerepet játszhatnak, mivel az AChE aktivitása és más kolinerg folyamatok előfordulása nem korlátozódik az agy- és neuronszövetekre (Luo és mtsai., 2021).

Vizsgálatainkból a következő következtetések vonhatók le:

1. A viselkedési és a biokémiai tesztek is alátámasztják, hogy a KLO erősebb mérég, mint az IMI. A megnövekedett populációs hajlam majd kábulatot mutató testhelyzetek felvétele egy nagyságrenddel kisebb kezelési koncentrációban történt meg KLO alkalmazása esetén.

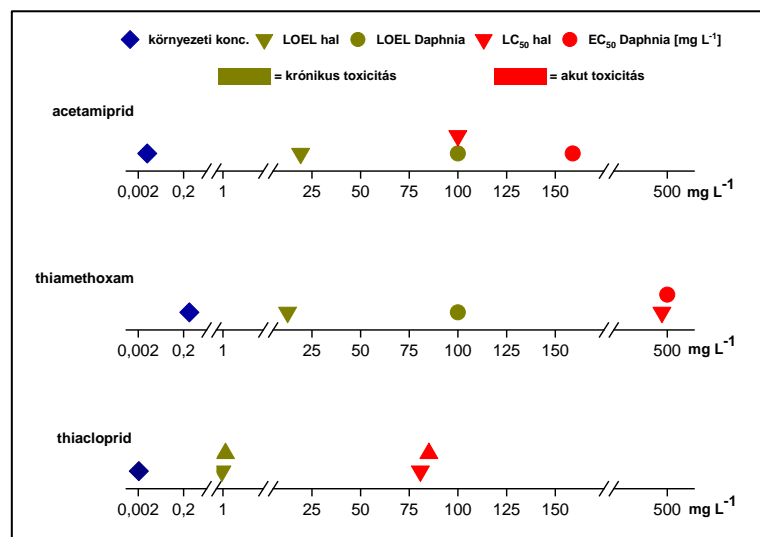
2. A KLO tiszta hatóanyagként és vegyszer formájában alkalmazva egyaránt igen agresszív neonikotinoidnak tekinthető. A toxikológiai kép még árnyaltabb, ha figyelembe vesszük, hogy a TIAM elsődleges metabolitja a KLO.
3. Az Európai Unióban egyidőben történő betiltásukat az IMI sokkal nagyobb mértékű felhasználása és a több negatív ökotoxikológiai tapasztalat eredményezhette.
4. A TIAK és a KLO esetében is kimutatható, hogy a formázott szer szignifikánsan nagyobb mértékű viselkedési és biokémiai változásokat képes indukálni az ízeltlábú szervezeteknél, mint a tiszta hatóanyag.
5. Fény derült arra, hogy az általunk alkalmazott *D. villosus* organizmus olyannyira ígéretes ökotoxikológiai tesztszervezet, hogy modellszervezetté nyilvánítása a neonikotinoid hatásvizsgálatok hatékonyságának növelése érdekében meglehetősen időszerű.
6. Az említett szubletális hatások gyakran csak a szennyezett élettér rekultiválásával szüntethetők meg, mert a vízi élőlények sok esetben nem képesek elhagyni a szennyezett vízteret, ennek következtében a neonikotinoidok szubletális koncentrációban történő krónikus expozíciója az adott biotópban akkumuláció révén letalitást eredményez. A szárazföldi fajok tekintetében a kijuttatott rovarölőszerek szignifikánsan nagyobb koncentrációban lehetnek jelen, mint vízi környezetben, így a nem célfajok egyedei bár elhagyhatják a szennyezett területet az akut expozíció általi kitettségük nagyobb arányban okozhat mortalitást.

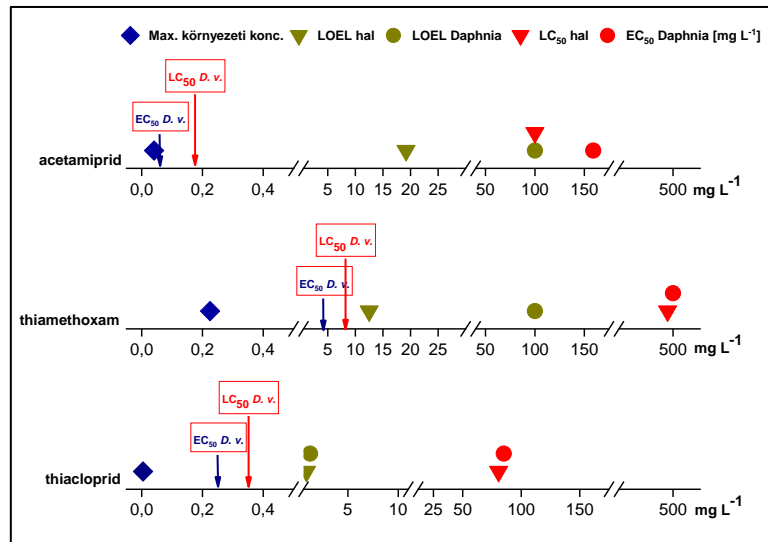
7. Mindezek miatt haladéktalanul szükséges a neonikotinoidok megreformálása, szelektivitásuk növelése, vagy új típusú rovarölő szerek kifejlesztése annak érdekében, hogy a lehető legkisebb legyen a nem célzott fajok veszélyeztetettsége.
8. Még mindig sok a kérdőjel, kulcsfontosságúak a további kutatások a neonikotinoidok nem célszervezeteket érintő hatásival kapcsolatban, mert csak így válik lehetővé a jól átgondolt irányelvek megalkotása a vízi ökoszisztéma megőrzése érdekében.

A KLO hatóanyag ökotoxikológiai hatásait tiszta és formázott vegyszerként Intézetünk más kollégái is vizsgálták a jelenleg egyik legnépszerűbb vízi modellfaj, a *D. magna* egyedein (Takács és mtsai., 2017). A vizsgálat során kiderült, hogy a formázott szer 46,5-szer mérgezőbb a *D. magna*-ra nézve, mint a kémiai tiszta KLO hatóanyag. Munkánk során mi is hasonló eredményre jutottunk a *D. villosus* testállattal kapcsolatban, azaz, hogy a formázott szer toxikusabb, mint önmagában a hatóanyag. Esetünkben azonban az eltérés három nagyságrend. Tehát a készítményben található lineáris-alkilbenzol származékok (LAS), mint leggyakrabban használt formázószernek igen jelentős szerepet játszanak az ökotoxicitásban. Ezért az iparnak a természetvédelmi szempontokat figyelembe véve, törekednie kell az atoxikus vivőanyagok alkalmazására.

Jelen kutatási munka során bizonyítást nyert az a világszerte számos neves ökotoxikológus neonikotinoid kutató által felállított hipotézis, miszerint a neonikotinoidok ökotoxikológiai hatásait elemző tesztekben mindeztidáig modellszervezetként alkalmazott (hal és rák) fajok viselkedési és biokémiai válaszai nem kellő mértékben képesek reprezentálni egy adott biotóp neonikotinoid terheltségét. Ez a felismerés azért fontos, mert a krónikus, kismértékű kitétség predesztinált hatásainak szignifikancia szintjeit befolyásolja a környezeti kockázatbecslések során (Zaller and Brühl, 2019). A gyakorlatban ugyanis a folyamatos kismértékű kitétség a jellemző világszerte. Ez alól a pulzus-koncentrációkat előidéző (pl. meteorológiai) események

kivételek. Bizonyított, hogy a pulzuskoncentrációk ismétlődése hosszútávon negatívan befolyásolja a legérzékenyebb fajok denzitását (Pestana és mtsai., 2009a, 2009b; Mohr és mtsai., 2012; Van Dijk és mtsai., 2013). Az általunk - jelen státuszban tesztállatként – alkalmazott *D. villosus* rákfaj százszor érzékenyebbnek mondható a *D. magna* modellszervezetenél (22-23. ábra). Ezek az ábrák arról is tanúskodnak, hogy miért gondolták eddig azt, hogy a vízi élővilágra nem veszélyesek a neonikotinoid rovarölő-szerek, valamint, hogy miért van szükség érzékenyebb tesztorganizmusok alkalmazására: Ezidáig olyan modellszervezeteken vizsgálták ezeket a szereket, melyek válaszreakciói szignifikánsan elmaradnak az újonnan alkalmazott, érzékenyebb fajokhoz képest.





22-23. ábra: A legelterjedtebb, ökotoxikológiában használt tesztszervezetek legkisebb megfigyelt, hatásos és halálos koncentráció-küszöbértékei három fajta neonikotinoid hatóanyag átlagos és maximum környezeti koncentrációjához viszonyítva.

Munkánkkal jelezni kívánjuk, hogy a kétpópos bolharák modellszervezetté történő minősítése számos kutatási eredmény alapján indokolt és időszerű lenne. Mindazonáltal ismert, hogy a *Gammarus* fajok és általában a rákok EC₅₀ dózisa (immobilitás, enzimaktivitás) 1-2 nagyságrenddel elmaradnak a vízi rovarok hasonló élettani jellemzőitől mind akut, mind krónikus tesztekben. Jelenlegi tudásunk szerint az árvaszúnyogok (*Chironomidae* család), kérészfajok (pl: *Cloeon dipterum* [Linnaeus, 1761]) és tegzesek (pl: *Sericostoma vittatum* [Rambur, 1942]) valamint rákok közül a *Ceriodaphnia dubia* [Richard, 1894] és a kagylósrákok osztályának fajai (*Cypridopsis vidua* [Mueller, 1776], *Cypretta seurati* [Gauthier, 1929], *Ilyocypris dentifera* [G.O. Sars, 1903]) jelzik elsőként az adott élettér neonikotinoid terheltségét (Sánchez-Bayo and Goka, 2006; Alexander és mtsai., 2007; Stoughton és mtsai., 2008; Pestana és mtsai., 2009a, 2009b; Goulson, 2013; Roessink és mtsai., 2013; Anderson és mtsai., 2015). Szubletális hatásként a tanulási, a navigációs és táplálékkeresési funkciók károsodnak leginkább, amelyek hosszútávon a biocönózisok nagymértékű károsodásához vezethetnek (van Dijk, 2010; Walker és mtsai. 2012; Gill és mtsai., 2012). Mindezek arra utalnak, hogy a

Gammarusok mellett az említett rovaraxonokat is modellszervezetté kellene nyilvánítani.

Ezzel nagy lépést tehetnénk a környezetkímélőbb mezőgazdaság kialakítása felé.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezésben közölt munka célja volt annak tanulmányozása, hogy, milyen viselkedési és élettani hatásokat gyakorolnak a különböző neonikotinoid rovarölő szerek a Balatonban igen elterjedt, invazív *D. villosus* rákfaj felnőtt egyedeire.

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

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 sárgaréppával *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.

A szisztemikus rovarölő szerek közé tartozó neonikotinoidokat világszerte egyre nagyobb arányban használják a termésátlagok növelésére. A kutatások rávilágítottak arra, hogy más rovarellenes szerekhez viszonyítva a neonikotinoidok hosszabb ideig jelen lehetnek a talajban, ahonnan a jó vízdékonyság révén könnyen kimosódhatnak és különböző, nem célzott életterekben is kifejthetik hatásaikat. A legfontosabb negatív hatásuk, hogy azokon a biotópokban, ahol megjelennek különböző időjárási események, pl: esőzések hatására a vártnál nagyobb koncentrációban fordulhatnak elő, amely potenciális veszélyt jelent a biocönózis szerkezeti és funkcionális egységére.

Az ökotoxikológiai tesztek különböző biomarker végpontokat vizsgálnak, melyek alapján megállapítható, hogy egy adott teszt- vagy modelszervezet (mely gyakran nem célszervezet) mekkora mértékű érzékenységet (szignifikáns biokémiai válaszok reprodukciója) tanúsít a vizsgált szer vonatkozásában. Jelen értekezés témájául szolgáló kutatásban a *D. villosus* felsőrendű rákfajt választottuk hatásviselőként. A *D. villosus* ökotoxikológiai tanulmányozásának jelentősége abban áll, hogy a világ egyik leginvazívabb édesvízi rákfaja, így szignifikáns hatást gyakorol a biocönózisokra. 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 $\mu\text{g/L}$), azonban a tiszta IMI magasabb kezelési koncentrációknál (160, 250 $\mu\text{g/L}$) 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 $\mu\text{g/l}$ töménységben szignifikánsan növelte a GST aktivitást. Az AchE enzimaktivitásváltozást meghatározva kimutattuk, hogy a KLO minden kezelt csoportban (160, 250 $\mu\text{g/L}$) szignifikánsan csökkentette az ingerületvezetést, míg az IMI a töményebb kezelési koncentrációk exponálásakor (80, 160, 250 $\mu\text{g/L}$) szignifikánsan serkentette azt. A TIAK nem váltott ki szignifikáns elváltozást az ingerületvezetésben, a Calypso 480 SC viszont 10, 30 és 100 $\mu\text{g/l}$ kezelési csoportoknál szignifikáns blokkoló hatással bír.

Kimutattuk azt is, hogy amennyiben a kísérleti alany fogságban tartva nem 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.

Annak megértése, hogy az állatok hogyan képesek sikeresen megbirkózni ezekkel a vegyületekkel, és hogyan tudnak megfelelő adaptív válaszokat kifejleszteni a viselkedéstől a molekuláris szintig, összetett probléma. Mivel azonban a legtöbb kutatás a neonikotinoidok méhekre gyakorolt hatására összpontosított, csak korlátozott adatok állnak rendelkezésre a vízi, nem célzott gerinctelenekre (pl. a rákfélékre) gyakorolt hatásokról.

Munkánkkal szeretnénk felhívni a figyelmet a vízi tesztállatokkal történő ökotoxikológiai tesztek jelentőségére, valamint arra, hogy milyen fontos a növényvédő-szerek szelektivitásának

növelése és az érzékeny fajok keresése. Ezen célok eszközeül szolgálhat a környezeti kockázatbecslések és a felszíni vizekre vonatkozó irányelvek rendszeres felülvizsgálata.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A Szegedi Tudományegyetem környezettudományi alap- és mesterképzése megalapozta szenvedélyemet és fokozta érdeklődésemet a természet- és környezetvédelem iránt. A szakmában egyre több megválaszolandó kérdés merül fel, melyeknek oka az egyre nagyobb

méreteket öltő humán beavatkozás a fizikai-kémiai és újabban biológiai folyamatokba. Ez utóbbinak részét képezi az egyre növekvő népesség élelmiszerellátási problémája, amelyet a termésátlagok növelésével igyekeznek megoldani. Ennek mindezidáig a vegyszeres kezelés képezte a döntő részét. Időről időre valamennyi világszerte népszerű peszticidre illetően bebizonyosodik, hogy a nem célzott élettereket és életközösségeket érintő hatások olyan mértékűek, hogy az adott szer betiltásra kerül. A munkánk során vizsgált Neonikotinoid rovarölő szerek szintén globális környezeti problémák előidézői lettek. A környezettudományban tevékenykedőket pedig a problémák megoldása motiválja. Ennek kapcsán lettem a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolájának doktorandusz hallgatója **Prof. Dr. Padisák Judit** professzor asszony témavezetésével. Kutatóhelyem az akkori nevén Balatoni Limnológiai Intézet Kísérletes Állattani Osztályának Környezetkémiai és Ökotoxikológiai Kutatócsoportja lett (mai név: Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Ökofiziológiai és Környezettoxikológiai Kutatócsoport), ahol **Dr. Győri János** témavezetésével, **Dr. Felpécziné Farkas Anna**, **Dr. Vehovszky Ágnes**, **Dr. Pirger Zsolt** útmutatásával végeztem munkámat. Ezúton is hálásan köszönöm mindennemű szakmai és baráti segítségüket, támogatásukat, tanácsaikat, melyekkel végig kísérték tanulmányaimat és hozzájárultak a szakmai sikereken túlmenően a pozitív, motiváló munkahelyi légkör kialakításához, valamint lendületet adtak új ötletek megszületéséhez.

Továbbá köszönettel tartozom a BLKI volt és jelenlegi igazgatójának: **Prof. Dr. G-Tóth Lászlónak** és **Dr. Erős Tibornak**, akik mindig szívélyes támogatásukról biztosítottak.

Az intézeti munkatársak kiemelném **Dr. Svigruha Réka**, **Dr. Fodor István**, **Dr. Molnár László**, **László Zita**, **Nagyné Fekete Zsuzsanna** személyét, akik szakmailag és barátilag egyaránt hozzájárultak munkám eredményességéhez.

Köszönet illeti a **Pannon Egyetem Mérnöki Kar** munkatársait beleértve **Limnológiai Intézeti Tanszék** munkatársát, **Siki Andreát**, akik háttértámogatásukkal segítettek munkámat, valamint a **Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezettudományi Intézet Agrár-környezettudományi Kutatóközpontjának** munkatársát **Mörthl Máriát** is, aki az analitikai mérések volt segítségemre.

Családomnak, barátaimnak is szeretném kifejezni hálás köszönetemet, mert nélkülük mindez nem jöhetett volna létre.

A személyes érintettségeken túl, köszönetemet fejezem ki az **Országos Tudományos Kutatási Alapnak** (OTKA K112712; Gy.J.), valamint a **Széchenyi Terv Plusz programnak** (RRF 2.3.1 21 2022 00008), hogy az Átaluk biztosított projektek anyagi forrásaiból finanszírozhattuk kutatásunkat.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

Akshay Krishnan, Christin Clyburn, P. N. (2018). *Developmental Effects of the Pesticide Imidacloprid on Zebrafish Body Length and Mortality* By Akshay Krishnan, Christin Clyburn, and Patrick Newcombe. Sidwell Friends School, Washington DC. 1–15.

Alexander, A. C., Culp, J. M., Liber, K., & Cessna, A. J. (2007). Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(8), 1726–1732. <https://doi.org/10.1897/07-015R.1>

- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A., & Qasem, I. B. (2014). In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 381–400. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i9.149>
- Alonso, Á., Lange, H. J. de, & Peeters, E. T. H. M. (2009). Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor. *Chemosphere*, 75(3), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.031>
- Anderson, J. C., Dubetz, C., & Palace, V. P. (2015). Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 505, 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.090>
- Anderson, T. A., Salice, C. J., Erickson, R. A., McMurry, S. T., Cox, S. B., & Smith, L. M. (2013). Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere*, 92(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.054>
- Andrén, C. M., & Wiklund, A. E. (2013). Science of the Total Environment Response of *Gammarus pulex* and *Baetis rhodani* to springtime acid episodes in humic brooks. *Science of the Total Environment*, 463–464, 690–699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.059>
- Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 23(3), 324–334. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>
- Ashwood-Smith, M. J., Grant, E. L., Heddle, J. A., & Friedman, G. B. (1977). Chromosome damage in chinese hamster cells sensitized to near-ultraviolet light by psoralen and angelicin. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 43(3), 377–385. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(77\)90059-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(77)90059-8)
- Bacela-Spychalska, K., Grabowski, M., Rewicz, T., Konopacka, A., & Wattier, R. (2013). The “killer Shrimp” *dikerogammarus villosus* (crustacea, amphipoda) invading alpine lakes: Overland transport by recreational boats and scuba-diving gear as potential entry vectors? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23(4), 606–618. <https://doi.org/10.1002/aqc.2329>
- Barbee, G. C., & Stout, M. J. (2009). Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Management Science*, 65(11), 1250–1256. <https://doi.org/10.1002/ps.1817>
- Barmantlo, S. H., Vriend, L. M., van Grunsven, R. H. A., & Vijver, M. G. (2019). Environmental levels of neonicotinoids reduce prey consumption, mobility and emergence of the damselfly *Ischnura elegans*. *Journal of Applied Ecology*, 56(8), 2034–2044. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13459>
- Bartlett, A. J., Hedges, A. M., Intini, K. D., Brown, L. R., Maisonneuve, F. J., Robinson, S. A., Gillis, P. L., & de Solla, S. R. (2018). Lethal and sublethal toxicity of neonicotinoid and

- butenolide insecticides to the mayfly, *Hexagenia* spp. *Environmental Pollution*, 238, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.004>
- Bartlett, A. J., Hedges, A. M., Intini, K. D., Brown, L. R., Maisonneuve, F. J., Robinson, S. A., Gillis, P. L., & de Solla, S. R. (2019). Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175(January), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.038>
- Basley, K., & Goulson, D. (2018). Neonicotinoids thiamethoxam and clothianidin adversely affect the colonisation of invertebrate populations in aquatic microcosms. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9593–9599. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1125-5>
- Beck, M. E., Gutbrod, O., & Matthiesen, S. (2015). Insight into the Binding Mode of Agonists of the Nicotinic Acetylcholine Receptor from Calculated Electron Densities. *ChemPhysChem*, 16(13), 2760–2767. <https://doi.org/10.1002/cphc.201500341>
- Beketov, M. A., & Liess, M. (2008). Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(2), 461–470. <https://doi.org/10.1897/07-322R.1>
- Belzunces, L. P., Tchamitchian, S., & Brunet, J. L. (2012). Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie 2012 43:3*, 43(3), 348–370. <https://doi.org/10.1007/S13592-012-0134-0>
- Benton, E. P., Grant, J. F., Nichols, R. J., Webster, R. J., Schwartz, J. S., & Bailey, J. K. (2017). Risk assessment of imidacloprid use in forest settings on the aquatic macroinvertebrate community. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(11), 3108–3119. <https://doi.org/10.1002/etc.3887>
- Benzidane, Y., Touinsi, S., Motte, E., Jadas-Hécart, A., Communal, P.-Y., Leduc, L., & Thany, S. H. (2010). Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Management Science*, 66(12), 1351–1359. <https://doi.org/10.1002/ps.2022>
- Berens, M. J., Capel, P. D., & Arnold, W. A. (2021). Neonicotinoid Insecticides in Surface Water, Groundwater, and Wastewater Across Land-Use Gradients and Potential Effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(4), 1017–1033. <https://doi.org/10.1002/etc.4959>
- Blarer, P., & Burkhardt-holm, P. (2016). Microplastics affect assimilation efficiency in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7584-2>
- Błońska, D., Grabowska, J., Kobak, J., Jermacz, Łukasz, & Bacela-Spychalska, K. (2015). Feeding preferences of an invasive Ponto-Caspian goby for native and non-native gammarid prey. *Freshwater Biology*, 60(10), 2187–2195. <https://doi.org/10.1111/fwb.12647>
- Bloor, M. C., Banks, C. J., & Krivtsov, V. (2005). Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environment International*, 31(2), 269–273. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2004.10.010>

- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(8), 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A., Noome, D. A., Simon-Delso, N., & Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Sánchez-Bayo, F., & Bijleveld van Lexmond, M. (2021). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(10), 11709–11715. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12853-6>
- Bonmatin, J. M., Noome, D. A., Moreno, H., Mitchell, E. A. D., Glauser, G., Soumana, O. S., Bijleveld van Lexmond, M., & Sánchez-Bayo, F. (2019). A survey and risk assessment of neonicotinoids in water, soil and sediments of Belize. *Environmental Pollution*, *249*, 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.099>
- Borsuah, J. F., Messer, T. L., Snow, D. D., Comfort, S. D., & Mittelstet, A. R. (2020). Literature review: Global neonicotinoid insecticide occurrence in aquatic environments. *Water (Switzerland)*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/w12123388>
- Borza, P., Huber, T., Leitner, P., Remund, N., & Graf, W. (2017). Current velocity shapes co-existence patterns among invasive *Dikerogammarus* species. *Freshwater Biology*, *62*(2), 317–328. <https://doi.org/10.1111/fwb.12869>
- Bownik, A., Pawłocik, M., & Sokołowska, N. (2017). Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia Magna*. *Polish Journal of Natural Sciences*, *32*(3), 481–493.
- Bromilow, R. H., Chamberlain, K., & Evans, A. A. (1990). Physicochemical Aspects of Phloem Translocation of Herbicides. *Weed Science*, *38*(16), 305–314.
- Buckingham, S. D., Lapied, B., le Corronc, H., Grolleau, F., & Sattelle, D. B. (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Journal of Experimental Biology*, *200*(21), 2685–2692. <https://doi.org/10.1242/JEB.200.21.2685>
- Bundschuh, M., Zubrod, J. P., Klemm, P., Elsaesser, D., Stang, C., & Schulz, R. (2013). Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of peak exposure scenarios on *Gammarus fossarum* using field relevant pesticide mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *95*, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.025>
- Butcherine, P., Kelaher, B. P., & Benkendorff, K. (2022). Assessment of acetylcholinesterase, catalase, and glutathione S-transferase as biomarkers for imidacloprid exposure in penaeid shrimp. *Aquatic Toxicology*, *242*(December 2021), 106050. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106050>
- Butcherine, P., Kelaher, B. P., Taylor, M. D., Barkla, B. J., & Benkendorff, K. (2020). Impact of imidacloprid on the nutritional quality of adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

Ecotoxicology and Environmental Safety, 198(February).
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110682>

Camp, A. A., & Buchwalter, D. B. (2016). Can't take the heat: Temperature-enhanced toxicity in the mayfly *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid. *Aquatic Toxicology*, 178, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.011>

Campbell, K. S., Keller, P. G., Heinzl, L. M., Golovko, S. A., Seeger, D. R., Golovko, M. Y., & Kerby, J. L. (2022). Detection of imidacloprid and metabolites in Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) brains. *Science of the Total Environment*, 813, 152424. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152424>

Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid metabolism: Compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2923–2931. <https://doi.org/10.1021/jf102438c>

Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58, 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>

Castillo, L. E., de la Cruz, E., & Ruepert, C. (1997). Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(1), 41–51. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160104>

Cavallaro, M. C., Morrissey, C. A., Headley, J. v., Peru, K. M., & Liber, K. (2017). Comparative chronic toxicity of imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam to *Chironomus dilutus* and estimation of toxic equivalency factors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(2), 372–382. <https://doi.org/10.1002/etc.3536>

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. (2007). Canadian Water Quality Guidelines for Protection of Aquatic Life: Imidacloprid. *Scientific Supporting Document*, 13826, 8 pp.

Chagnon, M., Kreutzweiser, D., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., Noome, D. A., & van der Sluijs, J. P. (2014). Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 119–134. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3277-x>

Challis, J. K., Cuscito, L. D., Joudan, S., Luong, K. H., Knapp, C. W., Hanson, M. L., & Wong, C. S. (2018). Inputs, source apportionment, and transboundary transport of pesticides and other polar organic contaminants along the lower Red River, Manitoba, Canada. *Science of the Total Environment*, 635, 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.128>

Chen, M. F., Huang, J. W., Wong, S. S., & Li, G. C. (2005). Analysis of insecticide clothianidin and its metabolites in rice by liquid chromatography with a UV detector. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13(3), 279–283. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2514>

Cimino, A. M., Boyles, A. L., Thayer, K. A., & Perry, M. J. (2017). Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: A systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 125(2), 155–162. <https://doi.org/10.1289/EHP515>

- Clough, S. R. (2014). Encyclopedia of Toxicology. In *Encyclopedia of Toxicology* (Issue 3. k.). Elsevier Inc. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543004383>
- Coleman, R. J., Hereward, J. P., de Barro, P. J., Frohlich, D. R., Adamczyk, J. J., & Goolsby, J. A. (2008). Molecular comparison of Creontiades plant bugs from South Texas and Australia. *Southwestern Entomologist*, 33(2), 111–117. <https://doi.org/10.3958/0147-1724-33.2.111>
- Consolandi, G., Ford, A. T., & Bloor, M. C. (2021). Feeding Behavioural Studies with Freshwater Gammarus spp.: The Importance of a Standardised Methodology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 253, 1–41. https://doi.org/10.1007/398_2019_36/COVER
- Contardo-Jara, V., & Gessner, M. O. (2020). Uptake and physiological effects of the neonicotinoid imidacloprid and its commercial formulation Confidor® in a widespread freshwater oligochaete. *Environmental Pollution*, 264, 114793. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114793>
- Cornwall, R., Toomey, B. H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W. M., & Epel, D. (1995). Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicology*, 31(4), 277–296. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00070-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00070-7)
- Crane, M., & Maltby, L. (1991). The lethal and sublethal responses of gammarus pulex to stress: Sensitivity and sources of variation in an in situ bioassay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(10), 1331–1339. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620101012>
- Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 49, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.04.006>
- Crossthwaite, A. J., Bigot, A., Camblin, P., Goodchild, J., Lind, R. J., Slater, R., & Maienfisch, P. (2017). The invertebrate pharmacology of insecticides acting at nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pesticide Science*, 42(3), 67–83. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D17-019>
- de Oliveira, I. M., Nunes, B. V. F., Barbosa, D. R., Pallares, A. M., & Faro, L. R. F. (2010). Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicology Letters*, 192(3), 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.11.005>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Dick, R. A., Kanne, D. B., & Casida, J. E. (2005). Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chemical Research in Toxicology*, 18(2), 317–323. <https://doi.org/10.1021/tx049737i>
- Ding, Z., Yang, Y., Jin, H., Shan, Z., Yu, H., Feng, J., Zhang, X., & Zhou, J. (2004). [Acute toxicity and bio-concentration factor of three pesticides on *Brachydanio rerio*]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology*, 15(5), 888–890. <http://europepmc.org/abstract/MED/15320417>

- Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F., & Viarengo, A. (2010). Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Science of the Total Environment*, *408*(18), 3775–3786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.040>
- Doolittle, D. J., Winegar, R., Lee, C. K., Caldwell, W. S., Hayes, A. W., & deBethizy, J. D. (1995). The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *344*(3–4), 95–102. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)00037-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)00037-2)
- Annual Report of the EFSA Journal 2013. (2014). *EFSA Supporting Publications*, *11* (12). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-721>
- Elbert, A., & Nauen, R. (2000). Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Management Science*, *56*(1), 60–64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200001\)56:1<60::AID-PS88>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200001)56:1<60::AID-PS88>3.0.CO;2-K)
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Englert, D., Bundschuh, M., & Schulz, R. (2012). Thiacloprid affects trophic interaction between gammarids and mayflies. *Environmental Pollution*, *167*, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.024>
- Ewere, E. E., Reichelt-Brushett, A., & Benkendorff, K. (2019). Imidacloprid and formulated product impacts the fatty acids and enzymatic activities in tissues of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Marine Environmental Research*, *151*(May), 104765. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104765>
- Ewere, E. E., Reichelt-Brushett, A., & Benkendorff, K. (2020). The neonicotinoid insecticide imidacloprid, but not salinity, impacts the immune system of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Science of the Total Environment*, *742*, 140538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140538>
- Ewere, E. E., Reichelt-brushett, A., & Benkendorff, K. (2021). Impacts of neonicotinoids on molluscs: What we know and what we need to know. *Toxics*, *9*(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/toxics9020021>
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., & Barata, C. (2011). Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic Toxicology*, *101*(1), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.004>
- Farkas, A., Somogyvári, D., Kovács, A. W., Mörtl, M., Székács, A., & 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>

- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., & Geffard, O. (2008). Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, *86*(3), 413–425. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2007.12.002>
- Finnegan, M. C., Baxter, L. R., Maul, J. D., Hanson, M. L., & Hoekstra, P. F. (2017). Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of aquatic primary producers, invertebrates, and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *36*(10), 2838–2848. <https://doi.org/10.1002/etc.3846>
- Fodor, I., Hussein, A. A. A., Benjamin, P. R., Koene, J. M., & Pirger, Z. (2020). The natural history of model organisms: The unlimited potential of the great pond snail, *lymnaea stagnalis*. *ELife*, *9*, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.56962>
- Food, E., & Authority, S. (2012). Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal*, *10*(6), 1–27. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2752>
- Ford, K. A., & Casida, J. E. (2006). Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: Diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chemical Research in Toxicology*, *19*(7), 944–951. <https://doi.org/10.1021/tx0600696>
- Ford, K. A., & Casida, J. E. (2008). Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(21), 10168–10175. <https://doi.org/10.1021/jf8020909>
- Forister, M. L., Cousens, B., Harrison, J. G., Anderson, K., Thorne, J. H., Waetjen, D., Nice, C. C., de Parsia, M., Hladik, M. L., Meese, R., van Vliet, H., & Shapiro, A. M. (2016). Increasing neonicotinoid use and the declining butterfly fauna of lowland California. *Biology Letters*, *12*(8). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0475>
- Garcia-Galan, M. J., Sordet, M., Buleté, A., Garric, J., & Vulliet, E. (2017). Evaluation of the influence of surfactants in the bioaccumulation kinetics of sulfamethoxazole and oxazepam in benthic invertebrates. *Science of The Total Environment*, *592*, 554–564. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.03.085>
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., & Wang, J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(6), 1856–1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>
- Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Gill, R. J., Ramos-rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, *490*(7422), 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature11585>
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Bernardo, A. di, Greatti, M., Giorio, C., & Tapparo, A. (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated

- seeds to seedling guttation drops: A novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology*, *102*(5), 1808–1815. <https://doi.org/10.1603/029.102.0511>
- Goatley, J. L., & Lewis, R. W. (1966). Composition of Guttation Fluid from Rye, Wheat, and Barley Seedlings. *Plant Physiology*, *41*(3), 373–375. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.373>
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, *50*(4), 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Grimm, M., Sedy, K., Sussenbacher, E., & Riss, A. (2012). *Existing Scientific Evidence of the Effects of Neonicotinoid Pesticides on Bees*. [http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/note/join/2012/492465/IPOL-ENVI_NT\(2012\)492465_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/note/join/2012/492465/IPOL-ENVI_NT(2012)492465_EN.pdf)
- Gross, K., & Rosenheim, J. A. (2011). Quantifying secondary pest outbreaks in cotton and their monetary cost with causal-inference statistics. *Ecological Applications*, *21*(7), 2770–2780. <https://doi.org/10.1890/11-0118.1>
- Guerra, L. J., do Amaral, A. M. B., de Quadros, V. A., da Luz Fiuza, T., Rosemberg, D. B., Prestes, O. D., Zanella, R., Clasen, B., & Loro, V. L. (2021). Biochemical and Behavioral Responses in Zebrafish Exposed to Imidacloprid Oxidative Damage and Antioxidant Responses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *81*(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00865-9>
- Gyori, J., Farkas, A., Stolyar, O., Székács, A., Mörtl, M., & Vehovszky, Á. (2017). Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. *Acta Biologica Hungarica*, *68*(4), 345–357. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.4.1>
- Hayasaka, D., Korenaga, T., Suzuki, K., Saito, F., Sánchez-Bayo, F., & Goka, K. (2012). Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *80*, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.004>
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, *336*(6079), 348–350. <https://doi.org/10.1126/science.1215039>
- Hladik, M. L., & Kolpin, D. W. (2016). First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA. *Environmental Chemistry*, *13*(1), 12–20. <https://doi.org/10.1071/EN15061>
- Hladik, M. L., Kolpin, D. W., & Kuivila, K. M. (2014). Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environmental Pollution*, *193*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.033>
- Hoffmann, E. J., & Castle, S. J. (2012). Imidacloprid in melon guttation fluid: A potential mode of exposure for pest and beneficial organisms. *Journal of Economic Entomology*, *105*(1), 67–71. <https://doi.org/10.1603/EC11251>

- Hong, X., Zhao, X., Tian, X., Li, J., & Zha, J. (2018). Changes of hematological and biochemical parameters revealed genotoxicity and immunotoxicity of neonicotinoids on Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Pollution*, *233*, 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.036>
- Hook, S. E., Doan, H., Gonzago, D., Musson, D., Du, J., Kookana, R., Sellars, M. J., & Kumar, A. (2018). The impacts of modern-use pesticides on shrimp aquaculture: An assessment for north eastern Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *148*(November 2017), 770–780. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.028>
- Houchat, J. N., Cartereau, A., le Mauff, A., Taillebois, E., & Thany, S. H. (2020). An overview on the effect of neonicotinoid insecticides on mammalian cholinergic functions through the activation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph17093222>
- Houndji, M. A. B., Imorou Toko, I., Guedegba, L., Yacouto, E., Agbohessi, P. T., Mandiki, S. N. M., Scippo, M. L., & Kestemont, P. (2020). Joint toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *55*(7), 669–676. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1763712>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, A., van den Brink, N. W., Buijse, L., Roessink, I., & van den Brink, P. J. (2021). The toxicity and toxicokinetics of imidacloprid and a bioactive metabolite to two aquatic arthropod species. *Aquatic Toxicology*, *235*(December 2020), 105837. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105837>
- Huseth, A. S., & Groves, R. L. (2014). Environmental fate of soil applied neonicotinoid insecticides in an irrigated potato agroecosystem. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097081>
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Asano, T., Matsui, M., Sattelle, D. B., & Matsuda, K. (2014). Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the β 1 strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions. *Molecular Pharmacology*, *86*(6), 736–746. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094698>
- Iturburu, F. G., Zömisich, M., Panzeri, A. M., Crupkin, A. C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., & Menone, M. L. (2017). Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *36*(3), 699–708. <https://doi.org/10.1002/etc.3574>
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., & Trebše, P. (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target

- arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.015>
- Jermacz, Ł., & Kobak, J. (2018). The Braveheart amphipod: A review of responses of invasive *Dikerogammarus villosus* to predation signals. *PeerJ*, 2018(8).
<https://doi.org/10.7717/peerj.5311>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897–2908.
<https://doi.org/10.1021/jf101303g>
- Joachimsmeier, I., Pistorius, J., Heimbach, U., Schenke, D., Kirchner, W., & Zwerger, P. (2012). Frequency and intensity of guttation events in different crops in Germany. *11th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, Wageningen (The Netherlands), November 2-4, 2011*, 437(May), 87–90.
<https://doi.org/10.5073/jka.2012.437.020>
- Kagabu, S., Nishimura, K., Naruse, Y., & Ohno, I. (2008). Insecticidal and neuroblocking potencies of variants of the thiazolidine moiety of thiacloprid and quantitative relationship study for the key neonicotinoid pharmacophore. *Journal of Pesticide Science*, 33(1), 58–66.
<https://doi.org/10.1584/jpestics.R07-25>
- Kaplan, J. K. (2012). Colony Collapse Disorder: An Incomplete Puzzle. *American Bee Journal*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_4587
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., & Kawano, H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032432>
- Kiriyama, K., & Nishimura, K. (2002). Structural effects of dinotefuran and analogues in insecticidal and neural activities. *Pest Management Science*, 58(7), 669–676.
<https://doi.org/10.1002/ps.493>
- Klarich, K. L., Pflug, N. C., DeWald, E. M., Hladik, M. L., Kolpin, D. W., Cwiertny, D. M., & LeFevre, G. H. (2017). Occurrence of neonicotinoid insecticides in finished drinking water and fate during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology Letters*, 4(5), 168–173. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00081>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kollmeyer, W. D., Flattum, R. F., Foster, J. P., Powell, J. E., Schroeder, M. E., & Soloway, S. B. (1999). Discovery of the Nitromethylene Heterocycle Insecticides. In I. Yamamoto & J. E. Casida (Eds.), *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* (pp. 71–89). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67933-2_3
- Kunz, P. Y., Kienle, C., & Gerhardt, A. (2010). Gammarus spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests. *Reviews of Environmental*

Contamination and Toxicology, 205, 1–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5623-1_1/COVER

Lackmann, C., Šimić, A., Ečimović, S., Mikuška, A., Seiler, T. B., Hollert, H., & Velki, M. (2023). Subcellular Responses and Avoidance Behavior in Earthworm *Eisenia andrei* Exposed to Pesticides in the Artificial Soil. *Agriculture (Switzerland)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/agriculture13020271>

Lahive, E., O'Halloran, J., & Jansen, M. A. K. (2015). A marriage of convenience; a simple food chain comprised of *Lemna minor* (L.) and *Gammarus pulex* (L.) to study the dietary transfer of zinc. *Plant Biology*, 17(s1), 75–81. <https://doi.org/10.1111/PLB.12179>

Lapied, B., le Corronec, H., & Hue, B. (1990). Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Research*, 533(1), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91805-Q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91805-Q)

Lee-Jenkins, S. S. Y., & Robinson, S. A. (2018). Effects of neonicotinoids on putative escape behavior of juvenile wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) chronically exposed as tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(12), 3115–3123. <https://doi.org/10.1002/etc.4284>

Lu, Y., Wu, K., Jiang, Y., Xia, B., Li, P., Feng, H., Wyckhuys, K. A. G., & Guo, Y. (2010). Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328(5982), 1151–1154. <https://doi.org/10.1126/science.1187881>

Lu, Z., Challis, J. K., & Wong, C. S. (2015). Quantum Yields for Direct Photolysis of Neonicotinoid Insecticides in Water: Implications for Exposure to Nontarget Aquatic Organisms. *Environmental Science and Technology Letters*, 2(7), 188–192. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.5B00136/SUPPL_FILE/EZ5B00136_SI_001.PDF

Luo, T., Wang, X., & Jin, Y. (2021). Low concentrations of imidacloprid exposure induced gut toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 241(December 2020), 108972. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108972>

Ma, X., Li, H., Xiong, J., Mehler, W. T., & You, J. (2019). Developmental Toxicity of a Neonicotinoid Insecticide, Acetamiprid to Zebrafish Embryos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(9), 2429–2436. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05373>

Macaulay, S. J., Hageman, K. J., Alumbaugh, R. E., Lyons, S. M., Piggott, J. J., & Matthaei, C. D. (2019). Chronic Toxicities of Neonicotinoids to Nymphs of the Common New Zealand Mayfly *Deleatidium* spp. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(11), 2459–2471. <https://doi.org/10.1002/etc.4556>

Mahai, G., Wan, Y., Xia, W., Yang, S., He, Z., & Xu, S. (2019). Neonicotinoid insecticides in surface water from the central Yangtze River, China. *Chemosphere*, 229, 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.040>

Main, A. R., Headley, J. v., Peru, K. M., Michel, N. L., Cessna, A. J., & Morrissey, C. A. (2014). Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092821>

- Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E., & Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(3), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.07.008>
- Malhotra, N., Chen, K. H. C., Huang, J. C., Lai, H. T., Uapipatanakul, B., Roldan, M. J. M., Macabeo, A. P. G., Ger, T. R., & Hsiao, C. der. (2021). Physiological effects of neonicotinoid insecticides on non-target aquatic animals—an updated review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179591>
- Maloney, E. M., Liber, K., Headley, J. v., Peru, K. M., & Morrissey, C. A. (2018). Neonicotinoid insecticide mixtures: Evaluation of laboratory-based toxicity predictions under semi-controlled field conditions. *Environmental Pollution*, *243*, 1727–1739. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.008>
- Maloney, E. M., Taillebois, E., Gilles, N., Morrissey, C. A., Liber, K., Servent, D., & Thany, S. H. (2021). Binding properties to nicotinic acetylcholine receptors can explain differential toxicity of neonicotinoid insecticides in Chironomidae. *Aquatic Toxicology*, *230*, 105701. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2020.105701>
- Marlatt, V. L., Leung, T. Y. G., Calbick, S., Metcalfe, C., & Kennedy, C. (2019). Sub-lethal effects of a neonicotinoid, clothianidin, on wild early life stage sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Aquatic Toxicology*, *217*(June), 105335. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105335>
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*(11), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01820-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4)
- Matsuda, K., Shimomura, M., Ihara, M., Akamatsu, M., & Sattelle, D. B. (2005). Neonicotinoids Show Selective and Diverse Actions on Their Nicotinic Receptor Targets: Electrophysiology, Molecular Biology, and Receptor Modeling Studies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *69*(8), 1442–1452. <https://doi.org/10.1271/BBB.69.1442>
- Matsumura, F. (1985). Toxicological Studies in Insects. In *Toxicology of Insecticides* (pp. 299–345). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2491-1_6
- Miles, J. C., Hua, J., Sepulveda, M. S., Krupke, C. H., & Hoverman, J. T. (2017). Effects of clothianidin on aquatic communities: Evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174171. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174171>
- Mineau, P., & Palmer, C. (2013). Neonicotinoid Insecticides and Birds The Impact of the Nation’s Most Widely Used Insecticides on Birds. *American Bird Conservancy*, *1*, 2–97. <https://extension.entm.purdue.edu/neonicotinoids/PDF/TheImpactoftheNationsMostWidelyUsedInsecticidesonBirds.pdf>
- Mohr, S., Berghahn, R., Schmiediche, R., Hübner, V., Loth, S., Feibicke, M., Mailahn, W., & Wogram, J. (2012). Macroinvertebrate community response to repeated short-term pulses of

the insecticide imidacloprid. *Aquatic Toxicology*, 110–111, 25–36.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.016>

Mole, N., Williamson, S., Lievens, P., & Tyrell, K. (2013). Neonicotinoid restrictions present a unique opportunity to introduce safer agro-ecological approaches to pest management. *Outlooks on Pest Management*, 24(4), 156–159. https://doi.org/10.1564/v24_aug_03

Montiel-León, J. M., Muñoz, G., Vo Duy, S., Do, D. T., Vaudreuil, M. A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., & Sauvé, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution*, 250, 29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>

Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291–303.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>

Mörthl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Györi, J., & Székács, A. (2017). Occurrence of neonicotinoids in guttation liquid of maize—soil mobility and cross-contamination. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(9), 868–884.
<https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1370090>

Mörthl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Györi, J., & Székács, A. (2019a). Contamination of the guttation liquid of two common weeds with neonicotinoids from coated maize seeds planted in close proximity. *Science of the Total Environment*, 649, 1137–1143.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.271>

Mörthl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Györi, J., & Székács, A. (2019b). Contamination of the guttation liquid of two common weeds with neonicotinoids from coated maize seeds planted in close proximity. *Science of the Total Environment*, 649.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.271>

Mörthl, M., Vehovszky, Á., Klátyik, S., Takács, E., Györi, J., & Székács, A. (2020). Neonicotinoids: Spreading, translocation and aquatic toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/IJERPH17062006>

Muskó, I. B., Balogh, C., Tóth, Á. P., Varga, É., & Lakatos, G. (2007). Differential response of invasive malacostracan species to lake level fluctuations. *Hydrobiologia*, 590(1), 65–74.
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-0758-7>

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Elbert, A., Jeschke, P., & Tietjen, K. (2001). Acetylcholine Receptors as Sites for Developing Neonicotinoid Insecticides. *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, 77–105. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59549-3_4

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V. L., & Kausmann, M. (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76(2), 55–69. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8)

- Nauen, R., Tietjen, K., Wagner, K., & Elbert, A. (1998). Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Science*, 52(1), 53–57. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199801\)52:1<53::AID-PS621>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199801)52:1<53::AID-PS621>3.0.CO;2-6)
- Njattuvetty Chandran, N., Fojtova, D., Blahova, L., Rozmankova, E., & Blaha, L. (2018). Acute and (sub)chronic toxicity of the neonicotinoid imidacloprid on *Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 209, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.102>
- Oleson, T. (2017). Neonicotinoids: Prominent pesticides escape into the environment. In *Earth Magazine* (pp. 36–46). <https://www.earthmagazine.org/article/neonicotinoids-prominent-pesticides-escape-environment>
- Pagano, M., Stara, A., Aliko, V., & Faggio, C. (2020). Impact of neonicotinoids to aquatic invertebrates—in vitro studies on *mytilus galloprovincialis*: A review. In *Journal of Marine Science and Engineering* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1–14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jmse8100801>
- Paquet-Walsh, A., Bertolo, A., Landry, C., Deschamps, L., & Boily, M. (2019). Interactive effects of neonicotinoids and natural ultraviolet radiation on yellow perch (*Perca flavescens*) larvae. *Science of the Total Environment*, 685, 690–701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.113>
- Pervez, M., & Manzoor, F. (2021). A study on lethal doses of various pesticides on honeybees (*Apis mellifera* L.) – a laboratory trial. *Physiological Entomology*, 46(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/phen.12338>
- Pestana, J. L. T., Alexander, A. C., Culp, J. M., Baird, D. J., Cessna, A. J., & Soares, A. M. V. M. (2009). Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution*, 157(8–9), 2328–2334. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.027>
- Pestana, J. L. T., Loureiro, S., Baird, D. J., & Soares, A. M. V. M. (2009). Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology*, 93(2–3), 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.008>
- Pilot, G., Stransky, H., Bushey, D. F., Pratelli, R., Ludewig, U., Wingate, V. P. M., & Frommer, W. B. (2004). Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from hydathodes of arabidopsis leaves. *Plant Cell*, 16(7), 1827–1840. <https://doi.org/10.1105/tpc.021642>
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., van der Sluijs, J. P., van Dyck, H., & Wiemers, M. (2014). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68–102. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Platvoet, D., van der Velde, G., Dick, J. T. A., & Li, S. (2009). Flexible omnivory in *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894) (Amphipoda) - Amphipod Pilot Species Project

(AMPIS) Report 5. *Crustaceana*, 82(6), 703–720.

<https://doi.org/10.1163/156854009X423201>

Pöckl, M. (2009). Success of the invasive Ponto-caspian amphipod *dikerogammarus villosus* by life history traits and reproductive capacity. *Biological Invasions*, 11(9), 2021–2041.

<https://doi.org/10.1007/s10530-009-9485-5>

Prosser, R. S., de Solla, S. R., Holman, E. A. M., Osborne, R., Robinson, S. A., Bartlett, A. J., Maisonneuve, F. J., & Gillis, P. L. (2016). Sensitivity of the early-life stages of freshwater mollusks to neonicotinoid and butenolide insecticides. *Environmental Pollution*, 218, 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.022>

Qi, S., Wang, D., Zhu, L., Teng, M., Wang, C., Xue, X., & Wu, L. (2018). Neonicotinoid insecticides imidacloprid, guadipyr, and cycloxaprid induce acute oxidative stress in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148(November 2017), 352–358.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.042>

Raby, M., Nowierski, M., Perlov, D., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D. G., & Sibley, P. K. (2018). Acute toxicity of 6 neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates.

Environmental Toxicology and Chemistry, 37(5), 1430–1445. <https://doi.org/10.1002/etc.4088>

Raby, M., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D. G., & Sibley, P. K. (2018a). Chronic effects of an environmentally-relevant, short-term neonicotinoid insecticide pulse on four aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*, 639, 1543–1552.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.259>

Raby, M., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D. G., & Sibley, P. K. (2018b). Relative chronic sensitivity of neonicotinoid insecticides to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 163(March), 238–244.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.086>

Radwan, M. A., & Mohamed, M. S. (2013). Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.019>

Rewicz, T., Grabowski, M., MacNeil, C., & Bączela-Spychalska, K. (2014). The profile of a ‘perfect’ invader – the case of killer shrimp, *Dikerogammarus villosus*. *Aquatic Invasions*, 9(3), 267–288. <https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.3.04>

Reynard, B. W. (2012). The Producer-Pollinator Dilemma: Neonicotinoids and Honeybee Colony Collapse. *Master of Environmental Studies Capstone Projects*, December.

Richardson, J. R., Fitsanakis, V., Westerink, R. H. S., & Kanthasamy, A. G. (2019). Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica*, 138(3), 343–362.

<https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>

Rittschof, D., & McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 369–373.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.008>

Robin, S. U. R., & Stork, A. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 35–40.

- Robinson, S. A., Chlebak, R. J., Young, S. D., Dalton, R. L., Gavel, M. J., Prosser, R. S., Bartlett, A. J., & de Solla, S. R. (2021). Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. *Environmental Pollution*, 284, 117149. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117149>
- Robinson, S. A., Richardson, S. D., Dalton, R. L., Maisonneuve, F., Bartlett, A. J., de Solla, S. R., Trudeau, V. L., & Waltho, N. (2019). Assessment of Sublethal Effects of Neonicotinoid Insecticides on the Life-History Traits of 2 Frog Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(9), 1967–1977. <https://doi.org/10.1002/etc.4511>
- Roessink, I., Merga, L. B., Zweers, H. J., & van den Brink, P. J. (2013). The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(5), 1096–1100. <https://doi.org/10.1002/etc.2201>
- Rundlöf, M., Andersson, G. K. S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B. K., Pedersen, T. R., Yourstone, J., & Smith, H. G. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550), 77–80. <https://doi.org/10.1038/nature14420>
- Sadaria, A. M., Supowit, S. D., & Halden, R. U. (2016). Mass Balance Assessment for Six Neonicotinoid Insecticides during Conventional Wastewater and Wetland Treatment: Nationwide Reconnaissance in United States Wastewater. *Environmental Science and Technology*, 50(12), 6199–6206. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01032>
- Sánchez-Bayo, F., & Goka, K. (2005). Unexpected effects of zinc pyrethrin and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 74(4), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.003>
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., & Hayasaka, D. (2016a). Contamination of the Aquatic Environment with Neonicotinoids and its Implication for Ecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 0(NOV), 71. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2016.00071>
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016b). Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment International*, 89–90, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>
- Sánchez-Bayo, F., & Hyne, R. v. (2014). Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*, 99, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.051>
- Sánchez-bayo, F., & Tennekes, H. A. (2020). Time-cumulative toxicity of neonicotinoids: Experimental evidence and implications for environmental risk assessments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051629>
- Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232(September 2018), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Sanchez-Bayo; Goka. (2006). Ecological Effects of the Insecticide Imidacloprid and a Pollutant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(6), 1677–1687.

- Sarah Könemann, Melissa von Wyl, C. V. B. (2022). Zebrafish Larvae Rapidly Recover from Locomotor Effects and Neuromuscular Alterations Induced by Cholinergic Insecticides. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00161>
- Schmidt, T. S., Miller, J. L., Mahler, B. J., van Metre, P. C., Nowell, L. H., Sandstrom, M. W., Carlisle, D. M., Moran, P. W., & Bradley, P. M. (2022). Ecological consequences of neonicotinoid mixtures in streams. *Science Advances*, 8(15), 1–13. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj8182>
- Schulz-Jander, D. A., & Casida, J. E. (2002). Imidacloprid insecticide metabolism: Human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters*, 132(1), 65–70. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00068-1)
- SEETHY, A. (2017). *Serum Protein and Albumin-Globulin Ratio*. <https://www.slideshare.net/ashikseethi007/serum-protein-and-albuminglobulin-ratio>
- Seifert, J. (2014). Neonicotinoids. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 3, 477–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00168-8>
- Shan, Y., Yan, S., Hong, X., Zha, J., & Qin, J. (2020). Effect of imidacloprid on the behavior, antioxidant system, multixenobiotic resistance, and histopathology of Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*, 218, 105333. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105333>
- Shi, X., Dick, R. A., Ford, K. A., & Casida, J. E. (2009). Enzymes and inhibitors in neonicotinoid insecticide metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4861–4866. <https://doi.org/10.1021/jf900250f>
- Shimomura, M., Yokota, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D. B., & Matsuda, K. (2006). Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site. *Molecular Pharmacology*, 70(4), 1255–1263. <https://doi.org/10.1124/mol.106.026815>
- Sillapawattana, P., & Schäffer, A. (2017). Effects of imidacloprid on detoxifying enzyme glutathione S-transferase on *Folsomia candida* (Collembola). *Environmental Science and Pollution Research*, 24(12), 11111–11119. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6686-1>
- Simon Gergely, Christiane Huxdorff, D. S. és P. J. A. kutatás helyszíni koordinátora: R. Z. (2013). Csepegő mérreg - Greenpeace Kutatási Laboratórium, Technikai Jelentés. *Greenpeace International*.
- Siregar, P., Suryanto, M. E., Chen, K. H. C., Huang, J. C., Chen, H. M., Kurnia, K. A., Santoso, F., Hussain, A., Hieu, B. T. N., Saputra, F., Audira, G., Roldan, M. J. M., Fernandez, R. A., Macabeo, A. P. G., Lai, H. T., & Hsiao, C. der. (2021). Exploiting the freshwater shrimp *neocaridina denticulata* as aquatic invertebrate model to evaluate nontargeted pesticide induced toxicity by investigating physiologic and biochemical parameters. *Antioxidants*, 10(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox10030391>
- Smital, T., & Kurelec, B. (1997). Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: In vivo demonstration of their effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(10), 2164–2170. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1997\)016<2164:IOTMRM>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1997)016<2164:IOTMRM>2.3.CO;2)

- Smital, T., Sauerborn, R., & Hackenberger, B. K. (2003). Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, *65*, 443–465. [https://doi.org/10.1016/S0166-445x\(03\)00175-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445x(03)00175-9)
- Sohn, L., Brodie, R. J., Couldwell, G., Demmons, E., & Sturve, J. (2018). Exposure to a nicotinoid pesticide reduces defensive behaviors in a non-target organism, the rusty crayfish *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicology*, *27*(7), 900–907. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1950-4>
- Somogyvári, D., Farkas, A., Mörtl, M., & Győri, 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*(July). <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109421>
- Somogyvári, D., Vehovszky, Á., Farkas, A., Horváth, R., & Győri, J. (2020). Multi-marker approach for the evaluation of environmental impacts of APACS 50WG on aquatic ecosystems. *Invertebrate Neuroscience*, *20*(4), 3–5. <https://doi.org/10.1007/s10158-020-00254-2>
- Song, M. Y., Stark, J. D., & Brown, J. J. (1997). Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *16*(12), 2494–2500. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161209>
- Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Ribeiro, C., Tiritan, M. E., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2019). Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of the Total Environment*, *649*, 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.309>
- Stara, A., Bellinvia, R., Velisek, J., Strouhova, A., Kouba, A., & Faggio, C. (2019). Acute exposure of common yabby (*Cherax destructor*) to the neonicotinoid pesticide. *Science of the Total Environment*, *665*, 718–723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.202>
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandoval, M., Albano, M., Zuskova, E., Velisek, J., Matozzo, V., & Faggio, C. (2020). Acute effects of neonicotinoid insecticides on *Mytilus galloprovincialis*: A case study with the active compound thiacloprid and the commercial formulation Calypso 480 SC. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *203*(June), 110980. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110980>
- Stara, A., Zuskova, E., Vesely, L., Kouba, A., & Velisek, J. (2021). Single and combined effects of thiacloprid concentration, exposure duration, and water temperature on marbled crayfish *Procambarus virginalis*. *Chemosphere*, *273*, 128463. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128463>
- Starner, K., & Goh, K. S. (2012). Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010-2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *88*, 316–321. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0515-5>
- Stehle, S., Ovcharova, V., Wolfram, J., Bub, S., Herrmann, L. Z., Petschick, L. L., & Schulz, R. (2023). Neonicotinoid insecticides in global agricultural surface waters – Exposure, risks

and regulatory challenges. *Science of the Total Environment*, 867(January).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161383>

Sterk, G., Peters, B., Gao, Z., & Zunkier, U. (2016). Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed OSR seeds on pollinating insects in Northern Germany : effects on large earth bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology*, 1666–1678.
<https://doi.org/10.1007/s10646-016-1730-y>

Stoughton, S. J., Liber, K., Culp, J., & Cessna, A. (2008). Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under constant- and pulse-exposure conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), 662–673. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9073-6>

Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Sverko, E., McGoldrick, D., & Marvin, C. H. (2017). Factors influencing the occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface waters of southern Ontario, Canada. *Chemosphere*, 169, 516–523.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.036>

Sumon, K. A., Ritika, A. K., Peeters, E. T. H. M., Rashid, H., Bosma, R. H., Rahman, M. S., Fatema, M. K., & van den Brink, P. J. (2018). Effects of imidacloprid on the ecology of sub-tropical freshwater microcosms. *Environmental Pollution*, 236, 432–441.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.102>

Sundukov, Yu. N. (2006). First record of the ground beetle *Trechoblemus postilenatus* (Coleoptera, Carabidae) in Primorskii krai. *Far Eastern Entomologist*, 165(April), 16.
<https://doi.org/10.1002/tox>

Süss, G. Bischoff, A. C. W. Mueller, L. B. (2006). Chemical and biological monitoring of the load of plant protection products and of zoocoenoses in ditches of the orchard region "Altes Land. *Nachrichtenblatt Des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 58(2), 28–42.

Székács, A., Mörtl, M., & Darvas, B. (2015). Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: Surveys in 1990-2015. *Journal of Chemistry*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/717948>

Takács, E., Klátyik, S., Mörtl, M., Rácz, G., Kovács, K., Darvas, B., & Székács, A. (2017). Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna*—the role of active ingredients and co-formulants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(9), 885–900. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1363196>

Tan, J., Galligan, J. J., & Hollingworth, R. M. (2007). Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology*, 28(4), 829–842. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.04.002>

Tapparo, A., Giorio, C., Marzaro, M., Marton, D., Soldà, L., & Girolami, V. (2011). Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6), 1564–1568.
<https://doi.org/10.1039/c1em10085h>

Tennekes, H. A., & Sánchez-Bayo, F. (2013). The molecular basis of simple relationships between exposure concentration and toxic effects with time. *Toxicology*, 309, 39–51.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.04.007>

- Terali, K. (2018). An evaluation of neonicotinoids' potential to inhibit human cholinesterases: Protein–ligand docking and interaction profiling studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 84(2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2018.06.013>
- Thany, S. H. (2011). Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology*, 60(4), 587–592. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.12.008>
- Thompson, D. A., Lehmler, H. J., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Vargo, J. D., Schilling, K. E., Lefevre, G. H., Peeples, T. L., Poch, M. C., Laduca, L. E., Cwiertny, D. M., & Field, R. W. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: Current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 22(6), 1315–1346. <https://doi.org/10.1039/c9em00586b>
- Thunnissen, N. W., Geurts, K. A. G., Hoeks, S., & Hendriks, A. J. (2022). Science of the Total Environment The impact of imidacloprid and thiacloprid on the mean species abundance in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 822, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153626>
- Tian, X., Yang, W., Wang, D., Zhao, Y., Yao, R., Ma, L., Ge, C., Li, X., Huang, Z., He, L., Jiao, W., & Lin, A. (2018). Chronic brain toxicity response of juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) to the neonicotinoid insecticides imidacloprid and nitenpyram. *Chemosphere*, 210, 1006–1012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.083>
- Tingle, C. C. D., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S., & King, W. J. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 176, 1–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7283-5_1
- Toğay, V. A., Yavuz Türel, G., Aşçı Çelik, D., Özgöçmen, M., Evgen Tülüceoğlu, E., Şen, İ., & Ayvaz, Y. (2021). DNA damage effect of cyprodinil and thiacloprid in adult zebrafish gills. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(12), 14482–14487. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11668-1>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339–364. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2009). Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: The determinants of life or death. *Accounts of Chemical Research*, 42(2), 260–269. https://doi.org/10.1021/AR800131P/SUPPL_FILE/AR800131P_SI_001.PDF
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid insecticides: Highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2883–2886. <https://doi.org/10.1021/jf103856c>

- Tomizawa, M., & Yamamoto, I. (1993). Structure-Activity Relationships of Nicotinoids and Imidacloprid Analogs. *Journal of Pesticide Science*, 18(1), 91–98.
<https://doi.org/10.1584/jpestics.18.91>
- Tufi, S., Stel, J. M., de Boer, J., Lamoree, M. H., & Leonards, P. E. G. (2015). Metabolomics to Explore Imidacloprid-Induced Toxicity in the Central Nervous System of the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Science and Technology*, 49(24), 14529–14536.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03282>
- van Dijk, T. C. (2010). *Effects of neonicotinoid pesticide pollution of Dutch surface water on non - target species abundance* (Issue MSc Thesis).
- van Dijk, T. C., van Staalduinen, M. A., & van der Sluijs, J. P. (2013). Macro-Invertebrate Decline in Surface Water Polluted with Imidacloprid. *PLoS ONE*, 8(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062374>
- Vehovszky, A., Farkas, A., Csikos, V., Szekacs, A., Mortl, M., & Gyori, J. (2018). Neonicotinoid insecticides are potential substrates of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the non-target invertebrate, *Dreissena* sp. *Aquatic Toxicology*, 205, 148–155.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.013>
- Vehovszky, Á., Szabó, H., Ács, A., Gyori, J., & Farkas, A. (2010). Effects of rotenone and other mitochondrial complex I inhibitors on the brine shrimp *Artemia*. *Acta Biologica Hungarica*, 61(4), 401–410. <https://doi.org/10.1556/ABiol.61.2010.4.4>
- Vehovszky, Farkas, A., Ács, A., Stoliar, O., Székács, A., Mörtl, M., & Gyori, J. (2015). Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquatic Toxicology*, 167, 172–179.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.009>
- Vogel, G. (2017). Where have all the insects gone? *Science*, 356(6338), 576–579.
<https://doi.org/10.1126/science.356.6338.576>
- von Hellfeld, R., Ovcharova, V., Bevan, S., Lazaridi, M. A., Bauch, C., Walker, P., Bennekou, S. H., Forsby, A., & Braunbeck, T. (2022). Zebrafish Embryo Neonicotinoid Developmental Neurotoxicity in the FET Test and Behavioral Assays. *Altex*, 39(3), 367–387.
<https://doi.org/10.14573/altex.2111021>
- von Wyl, M., Könemann, S., & vom Berg, C. (2023). Different developmental insecticide exposure windows trigger distinct locomotor phenotypes in the early life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 317(October 2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137874>
- Wallace, W. G., & Estephan, A. (2004). Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology*, 69(3), 289–297.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.010>
- Wang, Y., Lv, L., Yu, Y., Yang, G., Xu, Z., Wang, Q., & Cai, L. (2017). Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*). *Chemosphere*, 170, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>

- Wei, F., Wang, D., Li, H., Xia, P., Ran, Y., & You, J. (2020). Toxicogenomics provides insights to toxicity pathways of neonicotinoids to aquatic insect, *Chironomus dilutus*. *Environmental Pollution*, 260, 114011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114011>
- Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Supplementary Materials for Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.1215025>
- Whitfield-Aslund, M., Winchell, M., Bowers, L., McGee, S., Tang, J., Padilla, L., Greer, C., Knopper, L., & Moore, D. R. J. (2017). Ecological risk assessment for aquatic invertebrate communities exposed to imidacloprid as a result of labeled agricultural and nonagricultural uses in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(5), 1375–1388. <https://doi.org/10.1002/etc.3655>
- Wogram, J., & Liess, M. (2001). Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(3), 360–367. <https://doi.org/10.1007/S001280133/METRICS>
- Wood, T. J., & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environmental Science and Pollution Research* 2017 24:21, 24(21), 17285–17325. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-9240-X>
- Woodcock, B. A., Isaac, N. J. B., Bullock, J. M., Roy, D. B., Garthwaite, D. G., Crowe, A., & Pywell, R. F. (2016). Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12459>
- Woodward, G., Papantoniou, G., Edwards, F., Lauridsen, R. B., Woodward, G., Papantoniou, G., Edwards, F., & Lauridsen, R. B. (2008). Trophic trickles and cascades in a complex food web: impacts of a keystone predator on stream community structure and ecosystem processes. *Oikos*, 117(5), 683–692. <https://doi.org/10.1111/J.0030-1299.2008.16500.X>
- Wu, Z. S., Cheng, H., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2015). Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: Structures, biology, and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(8), 895–907. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.66>
- Xing, Z., Chow, L., Rees, H., Meng, F., Li, S., Ernst, B., Benoy, G., Zha, T., & Hewitt, L. M. (2013). Influences of sampling methodologies on pesticide-residue detection in stream water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9833-9>
- Yamamuro, M., Komuro, T., Kamiya, H., Kato, T., Hasegawa, H., & Kameda, Y. (2019). Neonicotinoids disrupt aquatic food webs and decrease fishery yields. *Science*, 366(6465), 620–623. <https://doi.org/10.1126/science.aax3442>
- Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., & Wang, J. (2015). Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.030>
- Zaller, J. G., & Brühl, C. A. (2019). Editorial: Non-target Effects of Pesticides on Organisms Inhabiting Agroecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 7(May), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00075>

Zhang, A., Kaiser, H., Maienfisch, P., & Casida, J. E. (2000). Insect nicotinic acetylcholine receptor: Conserved neonicotinoid specificity of [3H]imidacloprid binding site. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1294–1303. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.751294.x>

Zhang, X., Liu, X., Zhu, F., Li, J., You, H., & Lu, P. (2014). Field evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in China. *Crop Protection*, 58, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.12.026>

X. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ADATAI

X/1. Az értekezés témájához kapcsolódó idegen nyelvű közlemények

- Somogyvári, D., Vehovszky, Á., Farkas, A., Horváth, R., and Győri, J. (2020). Multi-marker approach for the evaluation of environmental impacts of APACS 50WG on aquatic ecosystems. *Invertebrate Neuroscience* 2020 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 Győri, 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

X/2. 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>

X/3. Az értekezés témájához kapcsolódó magyar és idegen nyelvű 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

XI. EREDMÉNYEK TÉZISSZERŰ ÖSSZEFOGLALÁSA

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 enzimaktivitásban 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-aktivitásban egyik kezelt csoportban sem (10, 30, 100, 250 µg/L)

XII. RESULTS OF THE STUDIES

1. APACS 50WG KLO-containing insecticide:

- at a concentration of 3.9 ng/l, during a treatment time of 3 hours, it significantly reduced the duration of immobility of the experimental subjects
- at a concentration of 4.5 ng/l during a treatment period of 1.5 hours, it significantly enhanced the functioning of the MXR cellular defense mechanism

2. Pure KLO:

- significantly reduced immobility time and swimming activity in all treatment groups (16, 32, 48 µg/L)
- did not result in significant changes in GST enzyme activity in any of the treated groups (16, 32, 48 µg/L)
- significant inhibition of AChE enzyme activity in all treated groups (16, 32, 48 µg/L)

3. The pure IMI:

- in lower treatment concentrations (20, 80 µg/L) the swimming activity was significantly reduced, while the immobility time during exposure in more concentrated solutions
- in more concentrated media (160, 250 µg/L) it caused a significant increase in GST enzyme activity
- significantly stimulated AChE activity in more concentrated solutions (80, 160, 250 µg/L)

4. The TIAK-containing Calypso 480 SC insecticide:

- induced changes similar to the pure form, however even a medium with a concentration of 30 µg/l resulted in a significant increase in the immobility duration
- significantly stimulated GST activity in treatments with concentrations of 10 and 30 µg/l
- significantly inhibited nerve conduction in the groups treated with concentrations of 10, 30, 100 µg/l

5. The pure TIAK:

- compared to the control, up to a treatment concentration of 100 µg/l, it increased the immobility duration in the treated individuals to an increasing extent, and at 100 µg/l
- did not significantly affect detoxification by GST in any of the treated groups (10, 30, 100, 250 µg/L)

- no significant change in AChE activity occurred in any of the treated groups (10, 30, 100, 250 $\mu\text{g/L}$)

XIII. FÜGGELÉK

Megjegyzés: A táblázatokban ismertetett referenciák nem szerepelnek külön az irodalomjegyzékben, azonban a táblázatok hivatkozott irodalmaiban fellelhetők.

XIII/1. A neonikotinoidok környezeti koncentrációira vonatkozó adatok

Mintaterület (szántóföldek száma)	Ország	Mintavételi időszak (év)	Mintavételi időszak (évszak)	Szántóföldi kultúra	Átlagos neonikotinoid koncentráció (ng/g)			Referencia
					IMI	KLO	TIAM	
28	USA	2012	Tavasszal, vetés előtt	változó	4	3,4	2,3	Stewart és Jones és mtsai (2014)
18	UK	2013		változó	1,62	4,89	0,4	Limay-Rios és mtsai (2015)
25	Kanada	2013 - 2014		kukorica		3,45	0,91	Botías és mtsai (2015)
7	UK	2013	Nyáron	olajrepce	3,03	13,28	3,46	
(10 hónappal vetés után)								
3	USA	2011 - 2013	Folyamatosan	kukorica és szója	2,0–11,2			de Perre és mtsai (2015)
50	USA	2012 - 2013	Nyáron	kukorica	7			Xu és mtsai (2016)
27	Kanada	2012 - 2014		olajrepce	5,7			Xu és mtsai (2016)
35	Németország	2013	Ősszel, vetés előtt	változó	2,1			Heimbach és mtsai (2016)
	Kanada			kukorica	55700			63400 Samson- Robert és mtsai (2014)

13. táblázat: Neonikotinoid koncentráció a művelési területek talajaiban (Wood és Goulson, 2017)

	TIAM	KLO	IMI	ACT	TIAK
Városi és vidéki minták					
Detektálási gyakoriság (%)	72	72	31	100	76
Maximum koncentráció (ng/g)	5,72	4,81	17	3,73	0,15
Geometriai átlag koncentráció (ng/g)	0,06	0,07	0,009	0,33	0,01
Városi minták					
Detektálási gyakoriság (%)	30	20	0	100	40
Maximum koncentráció (ng/g)	0,05	0,1	NF	0,75	0,05
Geometriai átlag koncentráció (ng/g)	0,002	0,001	NF	0,16	0,003
Vidéki minták					
Detektálási gyakoriság (%)	95	100	47	100	90
Maximum koncentráció (ng/g)	5,72	4,81	17	3,73	0,15
Geometriai átlag koncentráció (ng/g)	0,35	0,55	0,04	0,48	0,02

14. táblázat: Neonikotinoid koncentráció 29 üledékmintában Guangzhou, Dél-Kína (C. Zhang és mtsai., 2020)

Neonikotinoid	Mintavételi hely	Mintavételi időszak	Koncentráció (ng/g)	Referencia
IMI	6 angliai megye, 18 földterület	2013 tavasz, vetés előtt	< 0,09 - 10,7	Jones és mtsai (2014)
KLO			< 0,02 - 13,6	
TIAM			< 0,02 - 1,5	

15. táblázat: Angliai mezőgazdasági területek IMI, KLO, TIAM tartalma (Wood és Goulson, 2017b)

A földterületek középső részein nagyobb koncentrációban voltak jelen a Neonikotinoid rovarölő szerek, mint a mintázott területek periférikus pontjain.

	TIAM	KLO	IMI	ACT	TIAK
Városi és vidéki minták					
Detektálási gyakoriság (%)	100	100	93	100	76
Maximum koncentráció (ng/g)	156	68,7	273	189	3,74
Geometriai átlag koncentráció (ng/g)	43,8	22,4	29,1	25	0,15
Városi minták					
Detektálási gyakoriság (%)	100	100	90	100	40
Maximum koncentráció (ng/g)	43,2	22,7	72,6	50,1	3,17
Geometriai átlag koncentráció (ng/g)	25,5	12,8	14,8	21,3	0,011
Vidéki minták					
Detektálási gyakoriság (%)	100	100	95	100	95
Maximum koncentráció (ng/g)	156	68,7	273	189	3,74
Geometriai átlag koncentráció (ng/g)	58,3	30,1	41,4	27,1	0,6

16. táblázat: Neonikotinoid koncentráció 29 vízmintában Guangzhou, Dél-Kína (C. Zhang és mtsai., 2020)

Mintaterületek	Neonikotinoidok	Detektálási gyakoriság (%)	Maximum koncentráció (ng/g)	Geometriai átlag koncentráció (ng/g)
Mezőgazdasági területek	TIAM	42	30,2	0,02
	KLO	73	95,7	0,04
	IMI	75	147	0,58
	ACT	98	15,3	0,06
	TIAK	39	0,076	0,004
Kereskedelmi területek	TIAM	33	0,26	0,003
	KLO	67	1,85	0,02
	IMI	50	12,8	0,13
	ACT	83	0,21	0,03
	TIAK	33	0,03	0,003
Oktatási területek	TIAM	0	NF	0,001
	KLO	50	0,03	0,004
	IMI	0	NF	0,003
	ACT	100	0,03	0,02
	TIAK	50	0,03	0,009
Ipari területek	TIAM	42	0,81	0,005
	KLO	33	0,83	0,003
	IMI	8	5,76	0,005
	ACT	100	0,29	0,05
	TIAK	58	0,28	0,009
Parkok	TIAM	0	NF	0,001
	KLO	57	0,06	0,003
	IMI	0	NF	0,003
	ACT	86	0,38	0,03
	TIAK	57	0,04	0,004
Lakóövezetek	TIAM	20	2,34	0,002
	KLO	60	2,08	0,01
	IMI	10	28,2	0,006
	ACT	90	0,46	0,04
	TIAK	20	0,1	0,004
Közlekedési területek	TIAM	43	0,44	0,005
	KLO	71	0,31	0,03
	IMI	0	NF	0,003
	ACT	71	9,58	0,07
	TIAK	43	0,12	0,007

17. táblázat: Neonikotinoid koncentráció különböző funkcióval rendelkező földterületeken 104 talajminta alapján (C. Zhang és mtsai., 2020)

Régió	Mintagyűjtő területek száma	Mintaszám	Azonosítási ráta (%)	Koncentráció-túllépési ráta (%) (túllépési konc.:1,05 µg/l)	Maximum koncentráció (µg/l)
Imperial	9	14	92,9	7,1	3,29
Salinas	10	46	84,8	15,2	3,05
Santa Maria	4	15	100	40	1,38

18. táblázat: Detektált IMI koncentrációk Kalifornia három agrárregiójában 2010–2011 időszakban (Starner és Goh, 2012)

2012 tavasz, vetés előtt	Termény	Wetlandek száma	Detektálási arány (%)	IMI		TIAM		KLO		ACT							
				Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max						
	Barley	28	29	nem detektált				3,9	39,4	0,4	5,2						
	Canola	54	52	1,7	30,3	2,5	19,1	16,3	144	nem detektált							
	Oats	15	47	nem detektált		1,3	7	3,6	20	0,4	1,8						
	Peas	0		nem mintázott													
	Wheat	24	25	nem detektált		4,3	32,4	3,1	20,2	nem detektált							
	Grassland	15	7			nem detektált		1,1	7,9								
Összesen		136	36		30,3 (2%)		32,4 (10%)		144 (36%)		5,2 (1%)						
2012 nyár	Termény	Wetlandek száma	Detektálási arány (%)	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max						
	Barley	18	83	1,5	18,3	19,3	91,3	57,8	277	nem detektált							
	Canola	61	70	1,8	67,9	40,3	1490	142	3110	1,1	54,4						
	Oats	3	100	nem detektált		121	234	9,4	27	nem detektált							
	Peas	8	50			nem detektált		9,6	28,4								
	Wheat	29	62	15,9	256	2,3	37,7	35	518								
	Grassland	15	13	nem detektált				0,8	4,1	0,4	2,3						
Összesen		134	62		256 (8%)		1490		3110		54,4						
2012 ősz, betakarításkor	Termény	Wetlandek száma	Detektálási arány (%)	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max						
	Barley	13	8	nem detektált				nem detektált		1,1	7	nem detektált					
	Canola	35	20					2,2		20	2	30,9	0,6	11,8			
	Oats	3	33					nem detektált						4,2	12		
	Peas	5	40					3,6		14,6	nem detektált		0,5	1,6			
	Wheat	15	0					nem detektált									
	Grassland	9	22					11,9		100	nem detektált		0,4	2			
Összesen		80	16			nem		100	30,9			12,0					
2013 tavasz, vetés előtt	Termény	Wetlandek száma	Detektálási arány (%)	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max	Átlag	Max						
	Barley	16	94	nem detektált		19,8	107	53,2	157	nem detektált							
	Canola	51	98	1,4	4,8	12,6	93,5	38,5	173								
	Oats	3	100	nem detektált				41,9	79,4			16,9	20,4				
	Peas	6	100					nem detektált				33,3	60,6				
	Wheat	9	89					18,2				58,2	21,4	30,7			
	Grassland	5	0	nem detektált													
Összesen		90	91			4,8 (2%)		107	173	nem							

19. táblázat: Füves pusztákon elterülő vizes élőhelyeken (wetland) detektált Neonikotinoid koncentrációk (ng/l) (Közép-Saskatchewan, Kanada; 2012–2013) (Main és mtsai., 2014)

Mintavételi hely	KLO			IMI			TIAM		
	Azonosítási ráta (%)	Maximális koncentráció (ng/l)	Átlag koncentráció (ng/l)	Azonosítási ráta (%)	Maximális koncentráció (ng/l)	Átlag koncentráció (ng/l)	Azonosítási ráta (%)	Maximális koncentráció (ng/l)	Átlag koncentráció (ng/l)
Old Mans patak	95	257	17,1	38	42,7	<2	52	185	2,4
South Fork Iowa folyó	57	38	9,2	14	9,2	<2	57	31,9	5,2
North Fork Maquoketa folyó	57	73,8	4,6	14	4,8	<2	57	40,3	<2
	50	6,3	<2	13	24,9	<2	13	2,4	<2
Spencer, IA									
Maquoketa folyó	71	13,2	3,8	0	ND	<2	29	2,8	<2
Nishnabotna folyó	63	59,9	2,7	25	27,9	<2	38	57	<2
Iowa folyó	100	78,8	12,6	33	43	<2	67	14,8	7,2
Mississippi folyó	83	12,7	3,8	0	ND	<2	50	5,6	<2
Missouri folyó	50	25,9	3,9	33	17,1	<2	50	7,2	2,6

20. táblázat: A KLO, IMI, TIAM detektált koncentrációja víztestekben, különböző földrajzi helyeken (Hladik és mtsai., 2014)

Minta típus		ACT	TIAM	IMI	KLO	TIAK	DNF	NIP
Felszíni víztestből származó, tisztítatlan (16 db)	Kimutatási határ (ng/l)	30	60	40	70	40	30	40
	Kimutatási ráta (%)	88	44	100	94	0	25	25
	Átlag koncentráció (ng/l)	17,6	4,8	11,9	7,6	nem detektált	2,4	1,6
	Maximális koncentráció (ng/l)	34,4	29,6	31,7	29,5		20,1	10,2
Fitoremediáció előtti (5 db)	Kimutatási ráta (%)	80	0	100	80	0	20	40
	Átlag koncentráció (ng/l)	11,2	nem detektált	9	3,7	nem detektált	3	3,8
	Maximális koncentráció (ng/l)	15,1		13,1	5,8		15,1	16,7
Fitoremediáció utáni (5 db)	Kimutatási ráta (%)	80	0	100	40	0	20	20
	Átlag koncentráció (ng/l)	5,9	nem detektált	5,3	1,3	nem detektált	2,1	2,1
	Maximális koncentráció (ng/l)	13,2		9,2	3,3		10,5	10,4
Csapvízből származó (71 db)	Kimutatási ráta (%)	83	0	82	15	0	17	31
	Átlag koncentráció (ng/l)	5,8	nem detektált	4	0,6	nem detektált	1,8	2,5
	Maximális koncentráció (ng/l)	15,5		10,6	5,7		25	22,6

21. táblázat: Detektált Neonikotinoid koncentrációk csapvízben (ng/l) (Hangzhou, Kína) (C. Lu és mtsai., 2020)

Hely	Mintavételi darabszám	IMI		KLO		ACT		TIAM		Maximum koncentráció (össz ng/l)
		Detektálási ráta (%)	Átlag koncentráció (ng/l)	Detektálási ráta (%)	Átlag koncentráció (ng/l)	Detektálási ráta (%)	Átlag koncentráció (ng/l)	Detektálási ráta (%)	Átlag koncentráció (ng/l)	
Folyók és patakok										
Battle patak	3	100	2,3	67	0,46	33	<0,42	33	<0,12	8,4
Bassett patak	3	100	5	100	0,81	33	<0,42	67	0,34	19
Fish patak	3	100	11	100	2,2	33	<0,42	100	1,8	24
Minnesota folyó	3	100	1,6	100	10	33	<0,42	100	0,97	39
Kawishiwi folyó	4	25	<0,23	25	<0,42	25	<0,42	0	<0,12	2
Minnehaha patak	4	75	2,5	75	1,5	50	0,74	75	0,45	8,1
Blue Earth folyó	14	100	1,3	100	17	14	<0,42	100	3,8	43
Shingle patak	15	100	2,2	47	<0,42	27	<0,42	33	<0,12	21
Sauk folyó	4	100	1,5	75	4,6	75	1,5	100	1,3	13
Snake folyó	4	100	4,8	100	6,9	25	<0,42	75	2,1	32
Zumbro folyó	4	100	3,3	100	38	25	<0,42	100	8	140
Tavak										
Como	23	74	1,7	39	<0,42	4	<0,42	0	<0,12	13
Crosby	3	67	0,61	67	1,6	0	<0,42	33	<0,12	4,2
Gervais	3	100	3,5	33	<0,42	0	<0,42	33	<0,12	5,8
Island	3	33	<0,23	0	<0,42	0	<0,42	0	<0,12	0,65
Johanna	3	67	0,85	33	<0,42	0	<0,42	0	<0,12	2,6
Josephine	3	67	0,82	0	<0,42	33	<0,42	0	<0,12	4,3
Long	3	100	3,6	67	0,77	0	<0,42	0	<0,12	5,1
Owasso	3	67	0,88	67	0,73	33	<0,42	0	<0,12	4,6
Silver East	3	67	0,45	0	<0,42	0	<0,42	33	<0,12	1,6
Silver West	3	67	1,2	0	<0,42	0	<0,42	0	<0,12	1,7
Snail	3	67	0,65	67	0,48	0	<0,42	67	1,4	12
Kutak										
Cass	6	50	<0,23	50	<0,42	17	<0,42	17	<0,12	3,4
Dodge	6	0	<0,23	0	<0,42	0	<0,42	0	<0,12	<0,12
Hennepin	6	83	0,27	83	1,2	67	1,1	83	0,2	15
Hubbard	6	83	0,25	100	1,2	100	1,4	100	0,22	3,1
Olmstead	11	9	<0,23	9	<0,42	55	0,44	64	0,38	15

22. táblázat: Detektált IMI, KLO, ACT, TIAM koncentráció különböző víztestekben (Berens és mtsai., 2021)

XIII/2. A neonikotinoidek ökototoxicitására vonatkozó adatok

Termény	Neonikotinoid	Alkalmazási arány (g a.s./ha)	Maradvány pollenben (ng/g)		Maradvány nektárban (ng/g)		Átlag (ng/g) (Botfás et al, 2015; Xu et al, 2016)	
			Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Pollenben	Nektárban
Repce	KLO	25–80	5,95	19,04	5	16	2,27	2,18
Napraforgó	KLO	27		3,29		0,324		
Kukorica	KLO	25–125	7,38	36,88	n/a	n/a	1,8	
Repce	IMI	10–52,5	1,56	8,19	1,59	8,35		
Napraforgó	IMI	24–35		3,9		1,9		
Kukorica	IMI	54–268	3,02	15,01	n/a	n/a		
Gyapot	IMI	75–100	3,45	4,6	3,45	4,6		
Repce	TIAM	8–33,6	4 592	19,29	0,648	2,72	3,26	3,2
Napraforgó	TIAM	16,4–20,8	2 378	3,02	0,59	0,75		
Kukorica	TIAM	63–101	13 419	21 513	n/a	n/a		
Repce	TIAM						1,68	0,26

23. táblázat: KLO, IMI, TIAM maradvány-koncentrációk különféle termények pollen és nektármintáiban (1 g.a.s / ha = 10 mg/kg) (Wood és Goulson, 2017).

Peszticid	Termék	Fő felhasználási terület	Általánosan alkalmazott dózis (g/ha)	Akut LD ₅₀ (ng/méh)	LD ₅₀ a DDT-hez viszonyítva
DDT	Dinocide	inszekticid	200–600	27,000	1
TIAM	Proteus	inszekticid	62,5	12,600	2,1
Amitraz	Apivar	akaricid	–	12,000	2,3
ACT	Supreme	inszekticid	30–150	7,100	3,8
Kumafosz	Perizin	akaricid	–	3,000	9
Metiokarb	Mesurool	inszekticid	150–2,200	230	117
Fluvalinát	Apistan	akaricid	–	200	135
Karbofurán	Curater	inszekticid	600	160	169
Λ-cihalotrin	Karate	inszekticid	150	38	711
TIAM	Cruiser	inszekticid	69	5	5,400
Fipronil	Regent	inszekticid	50	4,2	6,475
IMI	Gaicho	inszekticid	75	3,7	7,297
KLO	Poncho	inszekticid	50	2,5	10,800
Deltametrin	Decis	inszekticid	7,5	2,5	10,800

24. táblázat: Különböző peszticidek méhekre vonatkozóan megállapított, DDT-hez viszonyított akut LD₅₀ határértékei (Pisa és mtsai., 2014)

LD ₅₀	ng/egyed	μL(guttációs folyadék) /egyed	μL(víz) /egyed	μL(víz) / egyed 1 hónappal vetés után
TIAM	5	0,09		6,04
KLO	3,79		0,324	3,61 (egyszeri begyűjtött vízmennyiségnek 5-16-szorosa)
KLO (TIAM)			0,558 (egy hordási mennyiség 50-100-szorosa)	
IMI	4,5 (Cresswell, 2011)			

25. táblázat: Neonikotinoid LD₅₀ dózisok a háziméh (*Apis mellifera*) vonatkozásában (Food és Authority, 2012)

kezelés időtartama (nap)	hatóanyag	koncentráció (ng/g, pollenben, cukoroldatban)		nem cél faj	hatás	referencia
28	TIAM	10		földi poszméh (<i>Bombus terrestris</i>)	fészek építési aktivitásban, reprodukciós rátában (28 nap után nincs lárvaképzés) szignifikáns változások	Elston és mtsai, 2013
77	IMI és KLO	10, 20, 50, 100		közönséges keleti poszméh (<i>Bombus impatiens</i>)	az 50-100 ng/g IMI /KLO már 6 hét után szignifikánsan megnöveli a királynő letalítási esélyeit, 11 hét múltán ez elmondható a 20 ng/g IMI/KLO koncentrációjú cukoroldatról is, bár a dolgozók halálozási aránya nem változott szignifikáns mértékben. A >10 ng/g IMI és 20 ng/g KLO hatására súlygyarapodás csökkenés figyelhető meg	Scholer és Krischik, 2014)
	TIAM KLO	2,87	0,45	Vörös kőművesméh (<i>Osmia bicornis</i>)	A kontrollhoz képest 22%-kal kevesebb fészket készítettek. Az utódhalandóság szignifikánsan, közel duplájára nőtt a kezelt csoportokban	Sandrock és mtsai, 2014
	KLO	10		<i>O. bicornis</i> és <i>B. terrestris</i>	Az <i>O. bicornis</i> nem rakott fészket és a méhsejt-képzést sem kezdte el. A <i>B. terrestris</i> csökkent kolóniamérettel és reprodukciós rátával válaszolt a kezelésre	Rundlöf és mtsai, 2015
28	IMI	10		<i>B. terrestris</i>	Lassabb növekedés, táplálkozási magatartás befolyásolása (több, hosszabb idejű repülés, kevesebb begyűjtött pollen).	Gill és mtsai, 2012 Gill és Raine, 2014
14	IMI	0,7 és 6,0			Szignifikánsan kevesebb pollent gyűjtöttek (31%), kevesebb pollengyűjtő repülés (23%)	Feltham és mtsai, 2014
13	TIAM	2,4 és 10			hosszabb pollengyűjtési idő, kevesebb gyűjtött pollen	Stanley és mtsai, 2015

26. táblázat: Neonikotinoidek méhekre gyakorolt hatásai (Wood és Goulson, 2017)

Taxon	Rovarölő szer	Hely	Mérési végpont	Hatás	LC/EC ₅₀	LOEC	Referencia
<i>Eisenia fetida</i>	IMI	Franciaország	Túlélés	-; -; ++		0,66; 0,66; 0,2 ppm	Dittbrenner és mtsai (2012)
			Túlélés, testtömeg	-; -		0,66; 0,2 ppm	Dittbrenner és mtsai (2011a)
<i>Lumbricus terrestris</i>			Túlélés	0; +; 0		4 ppm	Dittbrenner és mtsai (2012)
			Túlélés, testtömeg	0; -		2 ppm	Dittbrenner és mtsai (2011b)
			Mozgási aktivitás	-		2 ppm	
			Testtömeg-változás	-; -	NA; EC50=0,84 ppm	0,66; 0,66 ppm	Dittbrenner és mtsai (2010)
				-; -	LC50=10,7 ppm	1,89; 0,189 ppm	Capowiez és mtsai (2010)
			Metabolizmus, túlélés	0; -; ++		2; 2 ppm	Dittbrenner és mtsai (2012)
<i>Aporrectodea caliginosa</i>			Túlélés, testtömeg	-; -		2; 0,66 ppm	Dittbrenner és mtsai (2011a)
			Mozgási aktivitás	-		0,2 ppm	Dittbrenner és mtsai (2011b)
			Testtömeg-változás	-; -	NA; EC50=0,76 ppm	0,66; 0,66 ppm	Dittbrenner és mtsai (2010)
<i>Aporrectodea nocturna</i>			Tömegvesztés, elkerülés, mozgási aktivitás	-; +; -		0,5; 0,1; 0,05 ppm	Capowiez és Berard (2006)
			Mozgási aktivitás	-		0,1 ppm	Capowiez és mtsai (2006)
			Túlélés, tömegvesztés	-; -	LC50=3,74 ppm	0,1 ppm	Capowiez és mtsai (2005)
			Mozgási aktivitás	-		0,01 ppm	Capowiez és mtsai (2003)
<i>Allolobophora icterica</i>			Tömegvesztés, elkerülés, mozgási aktivitás	-; +; -		0,5; 0,01; 0,05 ppm	Capowiez és Berard (2006)
			Mozgási aktivitás	-		0,1 ppm	Capowiez és mtsai (2006)
			Túlélés, tömegvesztés	-; -	LC50=2,81 ppm	0,1 ppm	Capowiez és mtsai (2005)
	Mozgási aktivitás	-		0,01 ppm	Capowiez és mtsai (2003)		
<i>Dendrobaena octaedra</i>	Kanada	Túlélés, levélrágás	0; -		31 ppm	Kreutzweiser és mtsai (2009)	
		Túlélés, tömegvesztés, reprodukció, levélrágás	-; -; -; -	LC50=5,7 ppm	3; 3; 7; 7 ppm	Kreutzweiser és mtsai (2008b)	
		Túlélés, tömegvesztés	-; -		25; 14 ppm	Kreutzweiser és mtsai (2008b)	
<i>Eisenia fetida</i>	UK	Gubótermelés; tömegváltozás	-; -	EC50=1,41; EC50=2,77 ppm		Gomez-Eyles és mtsai (2009)	
	Kína	Túlélés	-	LC50=2,30 ppm		Zang és mtsai (2000)	
		Túlélés	-	LC50=2,30 ppm	1 ppm	Luo és mtsai (1999)	
		Túlélés	-; -	LC50=0,027 µg cm ⁻² ; LC50=2,82 ppm		Wang és mtsai (2012a)	
<i>Lumbricus terrestris</i>	USA	Táplálkozási aktivitás	-; -		43 mg m ⁻²	Tu és mtsai (2011)	

<i>Lumbricus rubellus</i>	IMI, TIAK	UK	Gubótermelés; testtömeg- változás, túlélés	0; -; ---; 0	EC50 IMI=1,46 ppm		Baylay és mtsai (2012)
<i>Eisenia fetida</i>	TIAK		Gubótermelés; testtömeg- változás	-; ---	EC50=0,968; EC50=19,0 ppm	0,291; 1,91 ppm	Gomez-Eyles és mtsai (2009)
	KLO	Kína	Túlélés	-; ---	LC50=0,45 µg cm ⁻²	Wang és mtsai (2012a)	
	ACT			-; ---	LC50=0,28 µg cm ⁻² ; LC50=6,06 µg cm ⁻² ; LC50=0,0088 µg cm ⁻² ; LC50=1,52 µg cm ⁻² ; LC50=0,22 µg cm ⁻² ; LC50=3,91	Wang és mtsai (2012b)	
	NIP			-; ---	Wang és mtsai (2012a)		
	Fipronil			Brazília	0; -; +	>1,000; 62; >10 ppm	Alves és mtsai (2013)
	<i>Dendrobaena octaedra</i>	IMI	Kanada	Túlélés, tömegvesztés, reprodukció	0; -; 0; -		11; 3,2 ppm
<i>Eisenia ésrei</i>	IMI	Brazília	Túlélés, levélrágás, reprodukció	-; ---; ++	LC50=25,53; EC50=4,07;	25; 0,75; 0,13 ppm	Alves és mtsai (2013)
Pheretima group	IMI	Dél-Afrika	Túlélés	-	EC50=0,11 mg/kg LC50=3,0 ppm		Mostert és mtsai (2002)
Pheretima group	Fipronil	Dél-Afrika	Túlélés	0		>300 ppm	Mostert és mtsai (2002)
<i>Apporectodea spp.</i>	KLO	USA	biomassza produkció	-; -; -	NA, terepi alkalmazás		Larson és mtsai (2012)

27. táblázat: Neonikotinoidok toxikológiai hatásai földigiliszta fajokon (Pisa és mtsai., 2014)

Neonikotinoid	Ismert méhtoxicitás (LD ₅₀ ; µg/méh)	
	Kontakt	Orális
ACT	7,1 - 8,09	8,85 - 14,52
KLO	0,022 - 0,044	0,00379
DNF	0,024 - 0,061	0,0076 - 0,023
IMI	0,0179 - 0,243	0,0037 - 0,081
TIAK	14,6 - 38,83	8,51 - 17,3
TIAM	0,024 - 0,029	0,005

28. táblázat: Neonikotinoidok LD₅₀ méhtoxicitása (K: közepes, 2-10,99 µg/méh; M: magas, <2µg/méh; enyhe: 11-100 µg/méh; nem számottevő: >100 µg/méh) (Reynard, 2012)

Összetevő	Emlősök (patkány)			Madarak (Japán fürj)	Halak (Szivárványos pisztráng, Ponty)
	LD ₅₀ (orális, mg/kg)	NOAEL (mg/kg/nap)	Karcinogenitás (patkány, egér)	LD ₅₀ (orális, mg/kg)	LC ₅₀ (ppm)
ACT	182	7,1	Nincs	180	> 100
KLO	> 5000	9,8	Nincs	> 2000	> 100
DNF	2400	127	Nincs	> 2000	> 40
IMI	450	5,7	Nincs	31	211
NIP	1628	—	—	> 2250	> 1000
Nitiazin	300	—	—	—	150
TIAK	640	1,2	Van	49	31
TIAM	1563	0,6	Van	1552	> 100
Nikotin	50–60	—	—	—	4

29. táblázat: A neonikotinoidok és a nikotin toxikológiai küszöbkonzentrációinak összehasonlítása különböző gerinces szervezeteken (Tomizawa és Casida, 2005).

Koncentráció (µg/L)	Nem célszervezet
23690	Cladocera
43926,5	Daphnia magna
1562,2	Decapoda
464,8	Isopoda
235,8	Amphipoda
258,7	Gammarus pulex
106,2	Mysida
73,6	Podocopida
711,3	Megaloptera
64,9	Hemiptera
55,2	Odonata
32,9	Diptera
9,3	Chironomus dilutus
6,9	Trichoptera
3,9	Ephemeroptera

30. táblázat: Néhány nem célszervezetnek számító taxon és az akut ökotoxicitási tesztek kezelési koncentrációinak geometriai átlaga (Morrissey és mtsai., 2015b).

Nem célszervezet	Hatóanyag	Koncentráció (µg/L)
rákok	Dinotefuran	37753,1
	Thiamethoxam	8864,5
	Acetamiprid	1271,4
	Clothianidin	842,3
	Thiacloprid	614,8
vízi rovarok	Imidacloprid	587
	Dinotefuran	229,8
	Thiamethoxam	44,8
	Acetamiprid	44,4
	Imidacloprid	26,8
	Clothianidin	25,3
	Thiacloprid	9,6

31. táblázat: A legérzékenyebbnek ítélt szervezeteken (rákok és vízi rovarok) tesztelt neonikotinoid hatóanyagok relatív toxicitása (Morrissey és mtsai., 2015b).

Hatóanyag	Koncentráció (µg/L)	Nem célszervezet	Hatás	Referencia
IMI és TIAK	0,01 - 24,1 (patakokban)	Diptera, Trichoptera, Ephemeroptera	növekedés gátlás	Pestana és mtsai, 2009; Mohr és mtsai, 2012; Berghahn és mtsai, 2012, Boettger és mtsai 2013
	0,01 - 240 (rizsföldeken)			Daam és mtsai, 2013; Hayasaka és mtsai, 2012a,b; Jinguji és mtsai, 2013; Sánchez-Bayo és Goka, 2006
TIAK	0,5 - 1	Gammarus fossarum	levélfogyasztás csökkenése, megnövekedett hajlam kannibalizmusra	Englert és mtsai 2012
IMI	30	Gammarus pulex	levélfogyasztás csökkenése (szignifikáns)	
	0,81 - 9		A táplálkozási viselkedés tartós megváltozása	
IMI	3–11 mg/kg juharlevél	levélaprító rovarok, avarlakó gliszták	csökkent táplálkozási aktivitás, tömegcsökkenés a gilisztáknál, szignifikáns mikrobiom aktivitás-csökkenés	Agatz és mtsai, 2014 Kreutzweiser és mtsai 2008

32. táblázat: Neonikotinoidok nem célszervezetekre kifejtett hatásai (Morrissey és mtsai., 2015b)

Taxon	Faj	IMI	KLO	Fipronil
Emlősök	Patkány (<i>Rattus norvegicus</i>)	425-475 (MT) ^a	5,000 (PNT) ⁱ	97 (MT) ^l
	Egér (<i>Mus musculus</i>)	131-300 (MT) ^a	>389 (MT) ⁱ	95 (MT) ^m
Madarak	Vadkacsa (<i>Anas platyrhynchos</i>)	283 (MT) ^b	>752 (ST) ^j	2,150 (PNT) ^l
	Gyűrűs nyakú			31 (HT) ^l
	Szürke fogoly (<i>Perdix perdix</i>) vörös lábú	13,9 (HT) ^c		
	fogoly (<i>Alectoris</i> <i>...fa</i>)			34 (HT) ^l
	Északi bobwhite fűj (<i>Colinus virginianus</i>)	152 (MT) ^a	>2,000 (PNT) ^k	11,3 (HT) ^l
	Japán fűj (<i>Coturnix japonica</i>)	31 (HT) ^a	423 (MT) ^k	
	Vadgalamb (<i>Columba livia</i>)	25-50 (HT) ^a		>2,000 (PNT) ^l
	Házi veréb (<i>Passer domesticus</i>)	41 (HT) ^a		
	Mezei veréb (<i>Spizella pusilla</i>)			1,120 (ST) ^l
	Kanári (<i>Serinus canaria</i>)	25-50 (HT) ^a		
	Zebra pinty (<i>Taeniopygia guttata</i>)			310 (MT) ^a
Halak	Kékkopoltyús naphal (<i>Lepomis macrochirus</i>)	105 (PNT) ^a	>117 (PNT) ^j	0,083 (VHT) ^l
	Japán ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)			0,34 (HT) ^l
	Nilusi tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)			0,042-0,147 (VHT-HT) ^l
	Szivárványos pisztráng (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	>83-211 (ST-PNT) ^a	>105 (PNT) ^j	0,246 (HT) ^l
	Birkafejű kölyökhal (<i>Cyprinodon variegatus</i>)	161 (PNT) ^a	>93,6 (ST) ⁱ	0,13 (HT) ^l
	Zebrahal (<i>Danio rerio</i>)	241 (PNT) ^c		
Kétéltűek	Fekete foltos tavi béka (<i>Rana nigromaculata</i>)	129-219 (PNT) ^{a,f}		
	Indiai rizsbéka (<i>Rana limnocharis</i>)	82-366 (ST-PNT) ^{a,f,g}		
	Nyugati kórus béka (<i>Pseudacris triseriata</i>)	194 (PNT) ^h		
	Amerikai varangy (<i>Bufo americanus</i>)	234 (PNT) ^h		
Hüllő	Rojtosujjú gyík (<i>Acanthodactylus dumerili</i>)			30 (HT) ^o

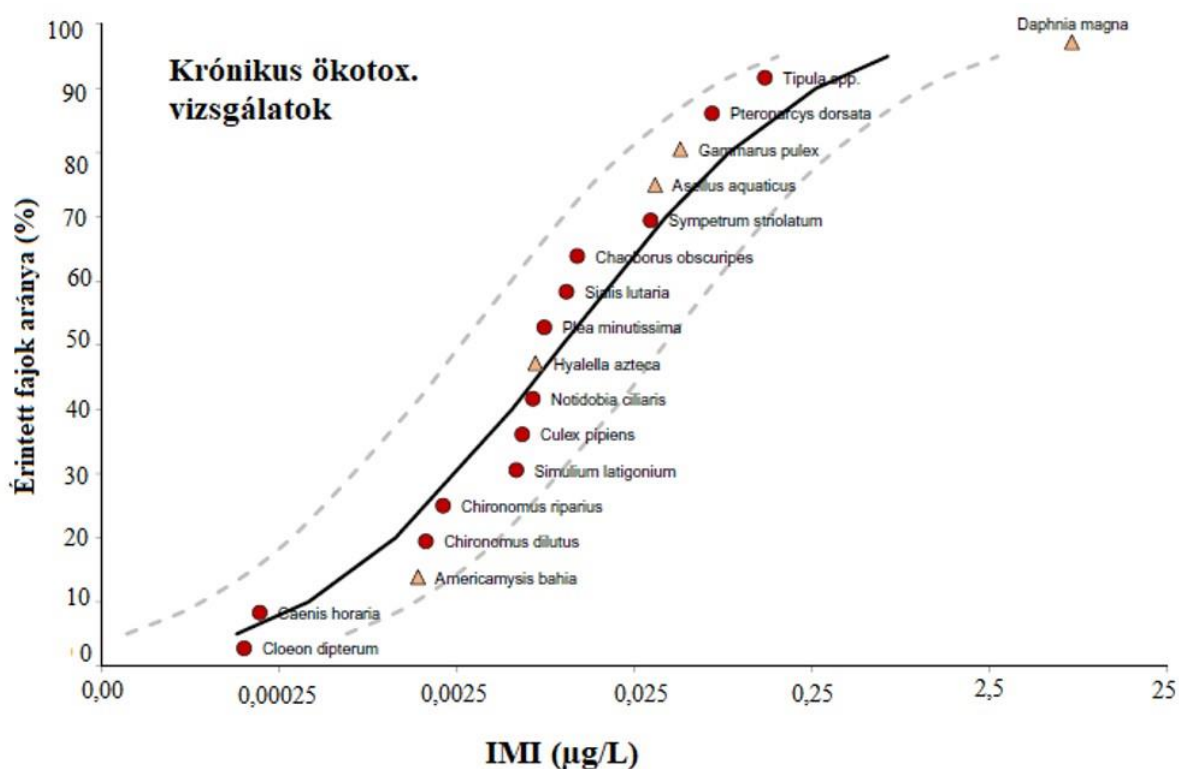
33. táblázat: Néhány faj akut LD₅₀ (emlősök, madarak, hüllők, mg/kg) és LC₅₀ dózisa (halak és kétéltűek, mg/L) IMI, KLO és fipronil akkumuláció esetén (Gibbons és mtsai., 2015)

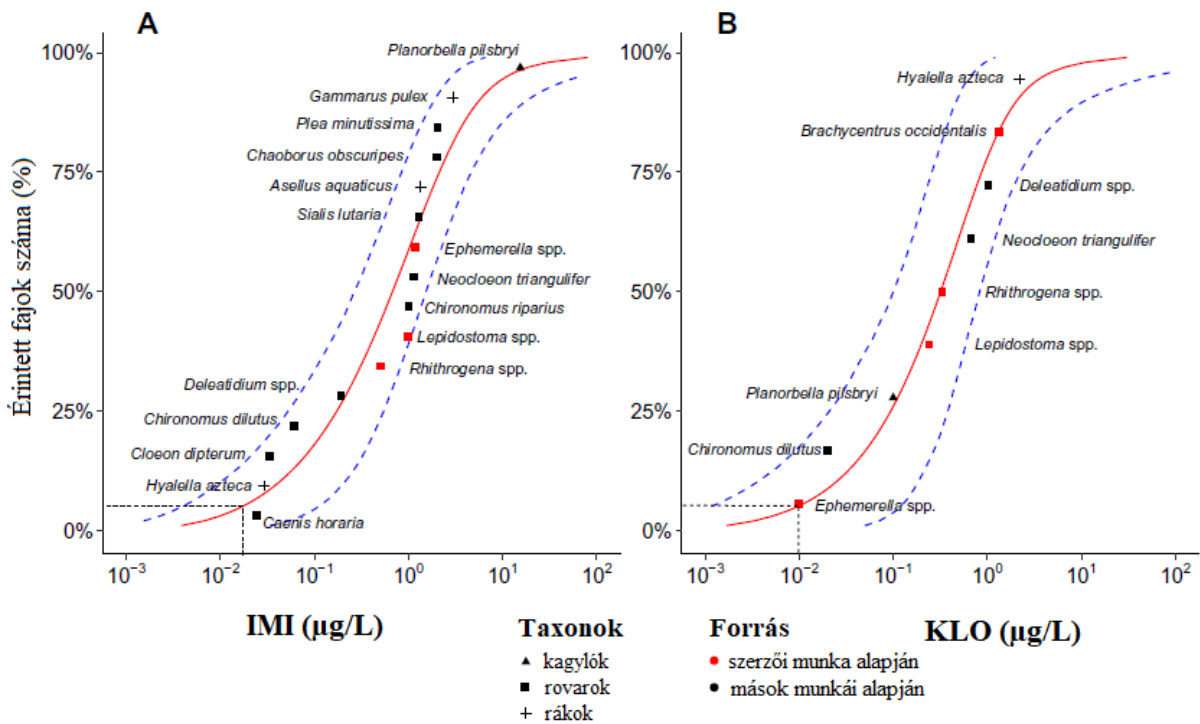
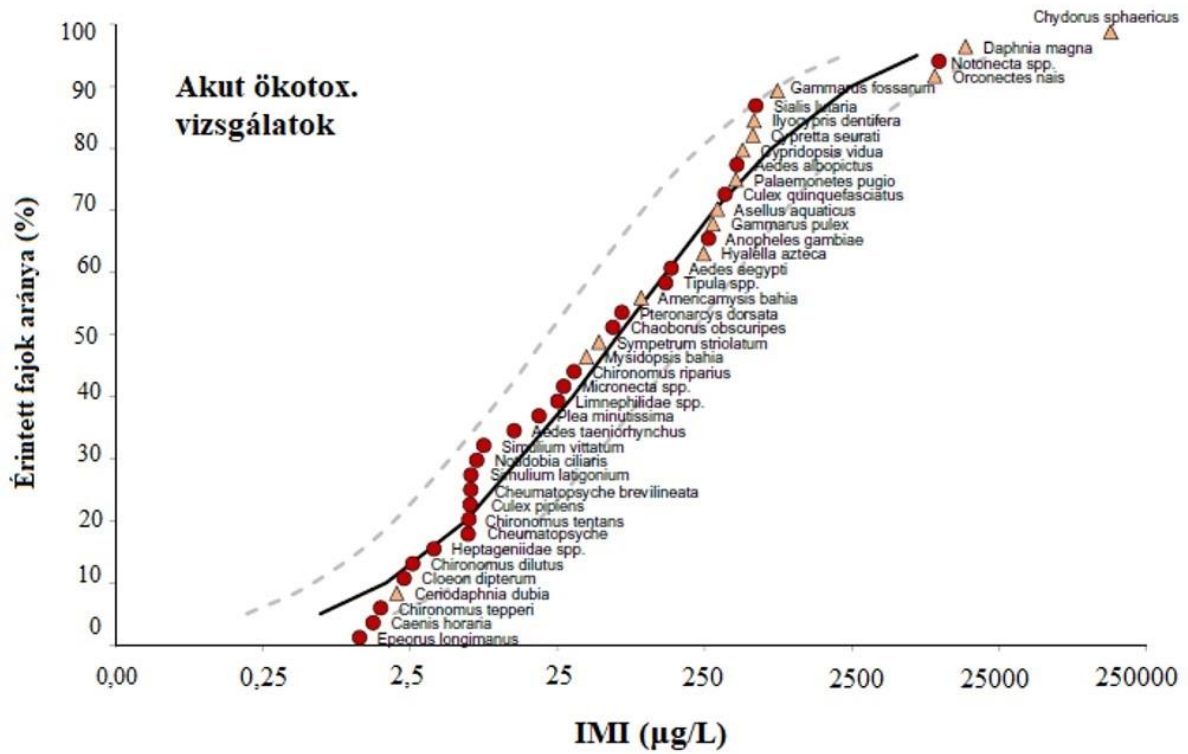
A toxicitás mértékének osztályozása az Amerikai Környezetvédelmi Ügynökség (USEPA) 2012-es jelentése alapján történt: PNT (nem mérgező), ST (enyhén mérgező), MT (közepesen mérgező), HT (erősen mérgező), VHT (nagyon erős mérgező hatású)

Emlősökre, madarakra és hüllőkre: PNT >2,000, ST 501–2,000, MT 51–500, HT 10–50, VHT <10. Halakra és kétéltűekre: PNT >100, ST >10-100, MT >1-10, HT 0,1-1, VHT <0,1.

A diaceton-alkohol formázószert tartalmazó fipronil oldat hétszer mérgezőbbnek bizonyult, mint a tiszta fipronil. (a: SERA 2005, b: Fossen 2006, c: Grolleau 1991, d: Cox 2001, e: Tisler és mtsai 2009, f: Feng és mtsai 2004, g: Nian 2009, h: Howard és mtsai 2003, i: DeCant and Barrett 2010, j: European Commission 2005, k: Mineau and Palmer 2013, l: Tingle és mtsai 2003, m: Connelly 2011,

n: Kitulagodage és mtsai 2008, o: Peveling and Demba 2003)





24-26. ábra: Az IMI (A) és a KLO (B) ökototoxicitása (EC_{20}) – különböző taxonokból származó fajok érzékenységének összehasonlítása. Az adatok 30 napos (piros jelölése), minimum

17 napos (fekete jelölések) mezokozmosz tesztek eredményeit mutatják. A kék szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia intervallumot jelzik. A vízszintes szaggatott vonalak jelzik azon veszélyességi koncentrációkat, melyek a fajok 5%-át veszélyeztetik (IMI: 17 ng/L, KLO: 10 ng/L. Az EPA vízi élőlényekre vonatkoztatott határértéke krónikus kezelésekre vonatkozóan: IMI: 10 ng/L, KLO: 50 ng/L. (Schmidt és mtsai., 2022)