Utjecaj herbicida na molekularne biomarkere kod gujavice vrste Dandrobaena veneta (Rosa, 1886)

Stjepanović, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:926821

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Nikolina Stjepanović

UTJECAJ HERBICIDA NA RAZLIČITE MOLEKULARNE BIOMARKERE KOD GUJAVICE VRSTE *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886)

Diplomski rad

OSIJEK, 2017.

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Različiti učinci okolišno relevantnih mješavina metal temeljenih nanočestica i pesticida na faunu tla: Nove smjernice za procjenu rizika (DEFENSoil)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-09-2014-4459); voditelj projekta prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ HERBICIDA NA RAZLIČITE MOLEKULARNE BIOMARKERE KOD GUJAVICE VRSTE *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886)

Nikolina Stjepanović

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Zavod za kvantitativnu ekologiju

Mentor: Doc. dr.sc. Davorka K. Hackenberger

Sažetak: Današnja intenzivna poljoprivreda rezultirala je sve većom uporabom pesticida koji nose određen rizik za okoliš. Stoga je predmet istraživanja u ovome radu odrediti toksičnost komercijalnih pripravaka herbicida na gujavice. Zbog njihove ekološke važnosti, gujavice su korištene kao indikatori za procjenu potencijalnog utjecaja kemikalija na organizme tla. U ovome radu istražen je utjecaj herbicida (dikvat, tembotrion, glifosat i nikosulfuron) na ekspresiju tri molekularna biomarkera (acetilkolinesteraze (AChE), glutation-S-transferaze (GST) i katalaze (CAT)), utjecaj na reprodukciju kod vrste *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886).

Ključne riječi: tembotrion, dikvat, glifosat, nikoslufuron, AChE, CAT, GST, reproduktivni uspjeh, gujavice

Broj stranica: 70
Broj slika: 23
Broj tablica: 9
Broj literaturnih navoda: 90
Jezik izvornika: hrvatski

Datum obrane: 26. 10. 2017.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **izv. prof. dr. sc Branimir K. Hackenberger**, predsjednik povjerenstva;
2. **doc. dr. sc. Davorka K. Hackenberger**, mentor i član;
3. **doc. dr. sc. Sandra Ečimović,** član;
4. **doc. dr. sc. Goran Palijan**, zamjena člana

Rad je pohranjen u:
knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **MSthesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Nature and Environmental Protection

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

THE INFLUENCE OF HERBICIDES ON BIOMARKERS OF EARTHWORM SPECIES *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886)

Nikolina Stjepanović

Thesis performed at: Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Subderpatment of quantitative ecology

Supervisor: Davorka K. Hackenberger, PhD, Assistant Professor

Abstract: Today's intensive agriculture has resulted in increasing use of pesticides that carry a certain environmental risk. Therefore, the subject of this study is to determine the toxicity of commercial herbicidal preparations. Due to their ecological significance, earthworms have been used as indicators for assessing the potential impacts of chemicals on soil organisms. This study investigated the effects of herbicides (diquat, tembotrione, glyphosate and nicosulfuron) on the expression of three molecular biomarkers (acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT)) and their effect on the reproduction of earthworm species *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886).

Keywords: tembotrione, diquat, glyphosate, nicosulfuron, AChE, CAT, GST, reproduction rate, earthworms

Number of pages: 70
Number of figures: 23
Number of tables: 9
Number of references: 90
Original in: Croatian

Date of the thesis defence: 26th October 2017.

Reviewers:

1. **Branimir K. Hackenberger**, PhD, Associate professor, commision president
2. **Davorka K. Hackenberger**, PhD, Assistant professor, supervisor and member,
3. **Sandra Ečimović**, PhD, Assistant professor, member
4. **Goran Palijan**, PhD, Assistant professor, substitute

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Davorki K. Hackenberger na prenesenom znanju, iskustvu nesebičnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala svim članovima Zavoda za kvantitativnu ekologiju na podršci i pomoći tijekom izrade diplomskog rada. Posebno hvala gospođi Luci Zelić na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mom suprugu Josipu, mami, sestri i Jozi na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci tijekom studiranja.

Hvala svima koji su svojim znanjem dali doprinos mom obrazovanju.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Poljoprivredna proizvodnja 1

1.2. Herbicidi 1

1.3.Sudbina herbicida u okolišu 2

1.4. Molekularni biomarkeri 4

1.4.1 Acetilkolinesteraza 4

1.4.2. Katalaza 5

1.4.3. Glutation-S-transferaza 6

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA 7

2. MATERIJALI I METODE 8

2.1. Eksperimentalni organizmi 8

2.1.1. Sistematika eksperimentalnog organizma 8

2.1.2. Biologija i ekologija eksperimentalnog organizma 8

2.2. Fizikalna i kemijska svojstva herbicida 10

2.2.1. Tembotrion (TBT) 10

2.2.2. Dikvat (DIQ) 12

2.2.3. Glifosat (GLF) 12

2.2.4. Nikosulfuron (NCS) 13

2.3. Izlaganje gujavica herbicidima 15

2.3.1. Kontakt test na filter papiru 15

2.3.2. Test sa umjetnim tlom 16

2.3.3. Reprodukcijski test 17

2.3.4. Priprema postmitohondrijske (S9) frakcije 20

2.4. Mjerenje aktivnosti 20

2.4.1. Acetilkolin esteraza (AChE) 20

2.4.2. Katalaza (CAT) 21

2.4.3. Glutation-S-transferaza (GST) 21
2.4.4. Proteini 21
2.5. Statistički obrada podataka 22
3. REZULTATI 23
3.1. Tembotrion (TBT) 23
3.1.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja tembotrionu 48 h, 7 dana, 28 dana 23
3.1.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja tembotrionu 48h, 7 dana, 28 dana 24
3.1.3. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) nakon izlaganja tembotrionu 48 h, 7 dana, 28 dana 26
3.2. Dikvat (DIQ) 28
3.2.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja dikvatu 48h, 7 dana, 28 dana 28
3.2.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja dikvatu 48h, 7 dana, 28 dana 30
3.2.3. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) nakon izlaganja dikvatu 48h, 7 dana, 28 dana 32
3.3. Glifosat (GLF) 34
3.3.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja glifosatu 48h, 7 dana, 28 dana 34
3.3.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja glifosatu 48h, 7 dana, 28 dana 36
3.3.3. Aktivnost glutation-S-trensferaze nakon izlaganja glifosatu 48h, 7 dana, 28 dana 37
3.4. Nikosulfuron (NCS) 39
3.4.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja nikosulfuronu 48h, 7 dana, 28 dana 39
3.4.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja nikosulfuronu 48h, 7 dana, 28 dana .. 41
3.4.3. Aktivnost glutation-S-transferaze nakon izlaganja nikosulfuronu 48h, 7 dana, 28 dana 43
3.5. Reproduktivni uspjeh gujavica 45
4. RASPRAVA 48

5. ZAKLJUČAK 53

6. LITERATURA 54

1. UVOD

1.1. Poljoprivredna proizvodnja

Tijekom posljednjih pedeset godina ljudska populacija se više nego udvostručila, a poljoprivredne površine su se povećale za svega 10% što za posljedicu ima porast intenzivne poljoprivrede i sve veću uporabu pesticida (Gaupp-Berghausen i sur., 2015). Proizvodnja hrane svakako je najvažnija preokupacija suvremene civilizacije u čemu poljoprivredna proizvodnja predstavlja najznačajniju granu gospodarstva odgovornu za osiguravanje potrebnih količina hrane (Baličević i sur., 2014). Sve usjeve prate i karakteristični štetni organizmi pa je nužno provoditi odgovarajuće mjere zaštite. Suvremena poljoprivredna proizvodnja, osim ekološke, nezamisliva je bez uporabe pesticida. Primjena pesticida spada u kemijske mjere suzbijanja štetnih organizama. Pesticidi su kemijske tvari sintetičkog ili biološkog porijekla koje služe za suzbijanje, reguliranje rasta, te za kontrolu neželjenih učinaka ciljnih organizama. Pesticidi se mogu klasificirati na različite načine ovisno o ciljanim skupinama na koje djeluju, kemijskoj prirodi i načinu djelovanja (Ware i Whitacre, 2004). Tako ih ovisno o ciljanim skupinama na koje djeluju možemo podijeliti na insekticide, fungicide, herbicide, akaricide, moluscide, rodenticide. Pesticidi mogu biti sintetičke kemijske tvari ili pak prirodnog podrijetla. Pesticidi su uglavnom toksične tvari kojima je namjena selektivno suzbijanje štetnika. Široke primjena pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji dovodi do zagađenja okoliša. Pesticidi ili njihovi ostaci su sveprisutni kontaminanti u ekološkim medijima, zraku, tlu, vodi te u ljudima, biljnim i životinjskim tkivima (Otitoju i Onwurah 2011). Među svim kategorijama pesticida smatra se da su insekticidi najviše toksični, dok su fungicidi i herbicidi drugi i treći na listi toksičnosti. Pesticidi ulaze u prirodne ekosustave na dva različita načina ovisno o njihovoj topivosti. Pesticidi topivi u vodi otapaju se i na taj način ulaze u podzemne vode, potoke, rijeke i jezera, što uzrokuje štetu neciljanim organizmima. S druge strane, pesticidi topivi u mastima ulaze u tijela životinja procesom bioakumulacije. Oni se apsorbiraju u masna tkiva životinjskih organizama procesima biomagnifikacije, stoga rezultiraju postojanjem pesticida u hranidbenim lancima dulje vrijeme (Mahmood i sur., 2016).

1.2. Herbicidi

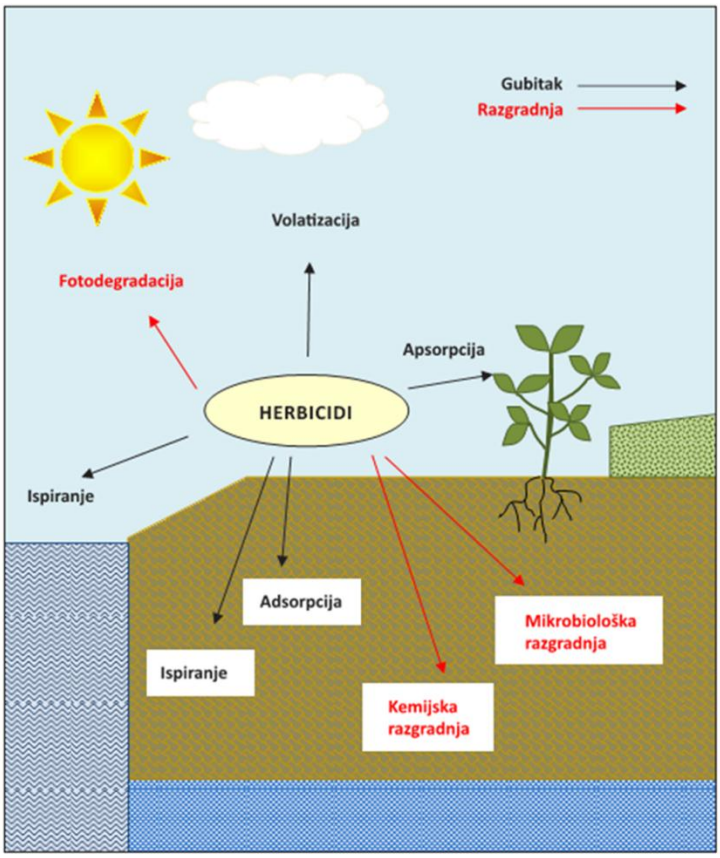
Herbicidi su kemijska sredstva sposobna suzbiti ili zaustaviti rast pojedinih biljaka. U razvijenim zemljama, herbicidi čine više od 70% ukupnih pesticida dostupnih u prodaji (Muthukaruppan i sur., 2005). Herbicidi mogu imati selektivno, uništavanju samo pojedinih vrste korova, i neselektivno djelovanje da uništavaju sve vrste korova. Herbicidi su sposobni zaustaviti ili usporiti neke životno važne fiziološke procese biljaka kada dospiju do mjesta

molekularnog djelovanja. S gledišta utjecaja na fiziološke procese mogu se podijeliti u različite grupe poput inhibitora acetolaktat sintaze (ALS), inhibitora fotosinteze u sustavu I, inhibitora biosinteze karotenoida, inhibitora glutamin sintetaze i druge. Herbicidi su prema kemijskoj pripadnosti, građi, strukturi i zajedničkim svojstvima razvrstani u trideset skupina, bez obzira na način djelovanja i vrijeme i način primjene. Razvrstavanje herbicida u skupine po kemijskoj pripadnosti zasniva se na kemijskoj sličnosti pojedinih herbicidno aktivnih molekula pa tako razlikujmo derivate fenoksi karboksilnih kiselina, nitrile, dipiridile, karbamate, amide, uracile i druge.

Perzistentnost herbicida u okolišu ovisi o brojnim čimbenicima poput njihove stabilnosti, koncentracije, tipa tla, mikroorganizama, temperature, klime. Perzistentnost predstavlja trajanje sredstva u aktivnoj formi na mjestu tretiranja ili u okolišu. Period kroz koji herbicidi ostaju aktivni u tlu je različit. Duljina poluživota parakvata iznosi i 1000 dana dok je duljina poluživota glifosata od 10 do 100 dana (Hornsby i sur., 1996). Ostaci perzistentnijih herbicida poput atrazina, metribuzina i trifluralina mogu ostati u tlu i više godina nakon primjene (Piotrowicz-Cieslak i Adomas, 2012).

1.3.Sudbina herbicida u okolišu

Ulaskom herbicida u okolišu oni se raspodjeljuju između četiri glavna kompartmenta: vode, zraka, tla i živih organizama. Kao i ostali pesticidi, herbicidi su česti kontaminanti površinskih voda i tla. Stoga organizmi u terestričkim i akvatičkim ekosustavima, od mikroorganizama do biljaka i životinja, mogu biti izloženi velikom broju tih zagađivala i njihovih metabolita. Postojanost herbicida u okolišu, povezana je s njihovom lipofilnošću, što ih čini prihvatljivima za progresivnu akumulaciju u biološkim tkivima (bioakumulaciju) i koncentriranju duž hranidbenih lanaca, povećavajući tako koncentraciju kontaminanta prema vrhu lanca kroz proces biomagnifikacije (Kortekamp 2011). S druge strane, kontaminacija vode poljoprivrednim otpadom i zračnim raspršivanjem herbicida može također imati opasne posljedice na javno zdravlje čak i na udaljenim područjima. Kada se primjenjuju na poljoprivredna područja herbicidi mogu imati različite sudbine. Herbicidi koji dospiju u tlo podliježu različitim procesima razgradnje (slika 1), a o kojima u velikoj mjeri ovisi perzistentnost herbicida.



Slika 1. Procesi razgradnje herbicida (foto – Baličević i sur., 2014).

Kod gubitka herbicida, molekule zadržavaju svoj prvobitni oblik, no nedostupne su biljkama. Procesi gubitka herbicida nastaju uslijed ispiranja u dublje slojeve kada herbicidi postaju nedostupni biljkama, isparavanjem tijekom i nakon primjene herbicida, što može ovisiti o meteorološkim čimbenicima i kemijskim svojstvima herbicida, apsorpciji od strane biljke, adsorpcije na minerale i organske koloide tla koja ovisi o tipu tla (Baličević i sur., 2014).

Prilikom procesa razgradnje molekule herbicida prelaze u inaktivne sastojke te počinju gubiti na svojoj toksičnosti. U procese razgradnje ubrajamo: kemijsku razgradnju, fotodegradaciju i razgradnju mikroorganizmima. Fotodegradacija se odvija na površini, ovisi o intenzitetu svjetlosti, karakteristikama tla, vegetaciji te kemijsko-fizikalnim osobinama herbicida. Fotodegradacija je razgradnja herbicida UV ili vidljivim svjetlom. Svi pesticidi su podložni fotodegradaciji u određenoj mjeri. Kemijska razgradnja uključuje kemijske reakcije razgradnje kao što su oksidacija, redukcija i hidroliza. Na kemijsku razgradnju utjecaj ima pH, vlažnost tla, adsorpcijski potencijal molekule i brzina kemijskih reakcija. Brzina kemijske razgradnje može se prikazati vremenom poluživota, odnosno vremenom koje je potrebno da se polovica pesticida razgradi, te njegova koncentracija padne na polovicu početne razine (Pierzynski i sur., 2000). Razgradnja mikroorganizmima najvažniji je proces razgradnje herbicida.

Mikroorganizmi svojim metabolizmom razgrađuju herbicide i pretvaraju ih u manje toksične spojeve. Mikrobiološka razgradnja se pojačava pri višim temperaturama, pri odgovarajućem pH tla, vlažnosti i prisutnosti kisika (Singh i Singh, 2016).

1.4. Molekularni biomarkeri

Biomarker je definiran kao biokemijska, stanična, fiziološka ili bihevioralna promjena koja se može procijeniti iz uzoraka tkiva ili cjelokupne jedinke te služi za procjenu izloženosti ili utjecaja jednog ili više toksičnih spojeva (Depledge 1994). Danas se biološki markeri koriste za analizu toksičnosti onečišćujućih tvari te za otkrivanje i procjenu zagađivača koji utječu na modifikacije u okolišu (Gastaldi i sur., 2007). Za razliku od standardnih mjerenja koncentracija štetnih tvari u zraku, vodi i tlu, prednost biomarkera je u tome što oni kvantitativno ukazuju na status organizma čime dobiveni rezultati imaju veći biološki značaj (Stepić 2010). Biomarkeri predstavljaju biološki odgovor na toksičnu kemikaliju izmjeren unutar organizma ili u produktu organizma (urinu, fecesu, kosi, peru, itd.) ukazujući na odstupanje od normalnog statusa koje ne može biti otkriveno u intaktnom organizmu (Van der Oost 2004). Biomarkeri predstavljaju koristan dijagnostički alat u kliničkim ispitivanjima u procjeni zdravstvenog rizika, ali i kao alat za predviđanje, te monitoring. Općenito gledano odgovor biomarkera smatra se međuproduktom između izvora onečišćenja i učinka više razine (Suter 1990). Biomarkeri daju integrirani pogled na koji su način organizmi pogođeni bioraspoloživom frakcijom zagađivača prisutnih u okolišu. Ti se biomarkeri smatraju signalima ranog upozorenja koji se mogu koristiti pri procjeni rizika od onečišćenja okoliša (Gastaldi i sur., 2007). Biomarkeri imaju primarnu ulogu u karakterizaciji to jest procjenjivanju ekološkog učinka. Procjenjivanje vjerojatnosti nepovoljnih ekoloških učinaka koji se mogu pojaviti ili se pojavljuju kao rezultat izloženosti jednom ili više štetnih čimbenika predstavlja značajan korak u zaštiti okoliša. Biomarkeri se sve više koriste u ekološkim procjenama rizika vodenih i kopnenih ekosustava kako bi se utvrdila učestalost i utjecaj izlaganja uzrokovanih ksenobioticima (Otitoju i Onwurah 2011).

1.4.1 Acetilkolinesteraza

Enzim acetilkolinesteraza (AChE) važan je molekularni biomarker. S obzirom na podjelu biomarkera prema WHO (1993) na biomarkere izloženosti, biomarke učinka i biomarkere osjetljivosti, AChE pripada biomarkerima izloženosti. Enzim acetilkolinesteraza pripada porodici enzima kolinesteraza (ChE) to su specijalizirane hidrolaze koje sudjeluju u razgradnji kolinskih estera. Fiziološka funkcija AChE je hidroliza neurotransmitera acetilkolina (ACh) u sinapsama, na acetat i kolin, čime je omogućen normalan prijenos živčanih impulsa.

Primarna uloga acetilkolinesteraze jest završetak sinaptičkog prijenosa impulsa, sprječavajući kontinuirano podražavanje receptora na živčanim završetcima

Acetilkolinesteraza se nalazi prvenstveno u mišićnom tkivu gdje sudjeluje u prijenosu živčanog impulsa u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama. AChE je enzim veličine 75 kD. AChE pripada skupini serinskih esteraza, tj. esteraza koje u aktivnom centru imaju serin. Aktivno mjesto AChE čini katalitička trijada koja se sastoji od Ser 200, His 440 i Glu 327. Ova skupina enzima snažno se inhibira organofosfornim i karbamatnim spojevima. Mehanizam inhibicije acetilkolinesteraze sastoji se u vezanju organofosfornih i karbamatnih pesticida na estersko mjesto enzima te reakcijama fosforilacije ili dekarbamilacije inaktiviraju enzim AChE jedan od najistraživanijih biomarkera kod gujavica. Ribera i sur., (2001) pratili aktivnost AChE nakon izlaganja gujavice *Eisenia andrei* insekticidu karbarilu zabilježena je inhibicija enzima nakon 14 dana izlaganja 77% u odnosu na kontrolu kod doze 50 $mgkg^{-1}$ tla. Gambi i sur., (2007) na istoj vrsti gujavice i istom ineskticidu također zabilježili inhibiciju AChE. Inhibiciju AChE uočili su također u svojim istraživanjima nakon izlaganja gujavica klorpirofos-etilu, metaksilu, miklobutanilu (Schreck i sur., 2008), atrazinu, ciazinu i klorpirifosu (Lydy i Linck, 2004), klorpirifosu i diazinonu (Booth i sur., 1998), klorpirifosu, butolakloru, diazinonu (Rodriguez-Castellanos i sur., 2007). Mekahlia i sur., (2016) zabilježili inhibiciju AChE nakon izlaganja herbicidu Sekator OD.

1.4.2. Katalaza

Katalaza je hematin-sadržavajući enzim prisutan u peroksisomima gotovo svih aerobnih stanica i služi za zaštitu stanica od toksičnih učinaka vodik peroksida, katalizirajući njegovu razgradnju u molekularni kisik i vodu bez nastajanja slobodnih radikala.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Vodik peroksid je nusprodukt koji nastaje oksidacijom masnih kiselina, taj reaktivni spoj kisika utječe na pomicanje ravnoteže oksidacijsko-redukcijskih procesa što rezultira oksidativnim stresom. Katalaza kao enzim koji katalizira razgradnju vodikova peroksida je mjerljivi pokazatelj oksidativnog stresa te ju možemo nazvati biomarkerom oksidativnog stresa. S obzirom na građu katalaza je tetramer izgrađena od četiri polipeptidna lanca, a svaki sadrži više od 500 aminokiselina. Unutar ovog tetramera nalaze se i četiri porfirinske hem skupine koje su odgovorne za enzimatsku aktivnost katalaze. Katalaza je važan biomarker izloženosti organizama pesticidima i metalima (Antunes i sur., 2008). Wang i sur. (2012) zabilježili prvo porast zatim pad aktivnosti katalaze nakon izlaganja gujavice *Eisenia fetida* pesticidima

klorpirifosu i fanvaleratu. Smanjenje aktivnosti katalaze kod vrste *Lumbriculus variegatus* nakon izlaganja atrazinu do 65 % u odnosu na kontrolu zabilježili su Contardo-Jara i sur. (2008). Brown i sur., (2004) također zabilježili smanjenje aktivnosti CAT nakon izlaganja vrste *Lumbricus rubellus* pirenu.

1.4.3. Glutation-S-transferaza

Glutation-S-transferaza je važan detoksikacijski enzim prisutan u velikom broju biljnih i životinjskih organizama (Bompart i sur., 2000). Glutation-S-transferaze (GST) čine skupinu citosolnih enzima, te imaju veliku važnost zbog svoje uloge u kataliziranju konjugacije različitih endogenih i egzogenih elektrofilnih supstrata sa tripeptidom gluationom (Clark i sur., 1986). Glutation (GSH) je endogeni tiolni antioksidant koji ima višestruku ulogu u ksenobiotičkom metabolizmu i prva je linija obrane (Palmeira, 1999). Konjugacija se odvija adicijom glutation iona na dvostruku vezu, cijepanjem epoksidnog mosta ili supstitucijom halogena ili drugih odlazećih skupina (Stenersen, 1984). GST pripada biomarkerima II faze metabolizma ksenobiotika. Enzimi faze II imaju vrlo važnu ulogu u održavanju homeostaze kao i u detoksikaciji i ekskreciji mnogih ksenobiotika. Contardo-Jara i sur., (2008) zabilježili su značajan porast GST nakon 1 dana izlaganja atrazinu u odnosu na kontrolu. Schreck i sur., (2008) kod vrste *Aporrectodea caliginosa nocturna* bilježe prvo porast aktivnost GST kod izlaganja različitim insekticidima, dok nakon 14 dana aktivnost GST je značajno inhibirana u odnosu na kontrolu. Ribera i sur., (2001) bilježe pad aktivnosti GST nakon izlaganja insekticidu karbamilu i nakon 48 h i nakon 14 dana. Mekahlia i sur., (2016) bilježe porast aktivnosti GST nakon izlaganja herbicidu Sekator OD.

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Utvrditi utjecaj različitih okolišno relevantnih koncentracija četiri različita herbicida, tembotriona, dikvata, glifosata i nikosulfurona na metabolizam gujavice vrste *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886) kroz promjene aktivnosti mjerenih molekularnih biomarkera acetilkolinesteraze (AChE), glutation-S-transferaze (GST) i katalaze (CAT) tijekom vremenski različitih (48h, 7 dana, 28 dana) izlaganja herbicidima. Utvrditi utjecaj navedenih herbicida na reproduktivni uspjeh gujavica.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizmi

2.1.1. Sistematika eksperimentalnog organizma

Carstvo: Animalia

Koljeno: Annelida

Razred: Clitellata

Podrazred: Oligochaeta

Red: Haplotaxida

Porodica: Lumbricidae

Rod: *Dendrobaena*

Vrsta: *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886)



Slika 2. *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886.) foto – N.Stjepanović

2.1.2. Biologija i ekologija eksperimentalnog organizma

Tijelo gujavice je bilateralno simetrično, izvana i iznutra jasno kolutićavo. Izvana tijelo obavija jednoslojna epiderma koja je prekrivena tankom albuminoznom kutikulom. Ispod epiderme nalazi se sloj prstenastih i uzdužnih mišića. Tjelesna šupljina je celom u kojoj je celomska tekućina koja ima funkciju hidroskeleta, a služi i kao oslonac prstenastim i uzdužnim mišićima Probavilo se pruža duž cijele dužine tijela, a probavni sustav se sastoji od usta, ždrijela, jednjaka, volje, želuca, crijeva i analnog otvora. Probava je ekstracelularna. Optjecajni sustav je zatvoren. Disanje se odvija preko kože. Funkciju ekskrecije su preuzeli protonefridiji i metanefridiji. Živčani sustav je ljestvičast. Gujavice su dvospolci, na trbušnoj strani 15. kolutića su muški, a na 14. kolutiću ženski spolni otvor. Oplodnja je vanjska.

S obzirom na načinu života te morfološke i fiziološke značajke gujavice prema Bouché, (1977) možemo svrstati u tri ekološke kategorije: epigejne, endogejne i anecične. Epigejne gujavice žive iznad mineralnog sloja tla, a ispod biljnih ostataka. Veličinom su male, tamno su pigmentirane i vrlo mobilne. Hrane se raspadnutim biljnim materijalom ili drugom organskom tvari. Endogejne gujavice kopaju plitke vodoravne hodnike u tlu koji nisu trajni. Uglavnom nisu značajnije pigmentirane, sporo se kreću, a mogu biti različitih veličina. Anecične gujavice žive u trajnim okomitim hodnicima u mineralnom sloju tla, do 3 m dubine. Vrste iz ove skupine su tamno pigmentirane na dorzalnoj strani tijela. *Dendrobaena veneta* (slika 3) je epigejna vrsta

koja živi u površinskim slojevima tla bogatim organskom materijom. Ima kratak životni ciklus, izlijeganje iz kokona traje tri do četiri tjedna, a spolnu zrelost postižu sa sedam do osam tjedana.



Slika 3. Vrsta *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886.) - foto: N. Stjepanović

Gujavice čine važnu komponentu tla, poboljšavaju rast biljaka povećavanjem plodnosti tla i kruženjem nutrijenata (Lee 1985). Imaju sposobnost povećati infiltraciju tla te smanjiti otjecanje vode. Mogu stimulirati mikrobnu aktivnost u tlu tijekom prolaska kroz njihov probavni sustav (Binet i sur., 1998). Gujavice povećavaju mineralizaciju organske tvari u tlu što povećava dostupnost hranjivih tvari, posebice dušika koji je glavni limitirajući nutrijent u terestričkim ekosustavima (Subler i sur., 1997). Gujavice modificiraju poroznost i agregaciju tla što poboljšava dostupnost vode i kisika biljkama. Također sudjeluju u proizvodnji regulatora rasta kroz simulaciju mikrobne aktivnosti te sudjeluju u kontroli štetnika i parazita (Zarea i Karimi 2012). Gujavice posjeduju niz ekoloških i fizioloških značajki koje ih čine izvrsnim biološkim indikatorima zagađenja tla (Sanchez-Hernandez, 2006). Prednosti gujavica kao povoljnih organizama u proučavanju toksikologije tla uključuju i jednostavan uzgoj u laboratoriju te lako mjerenje reprodukcije, rasta, akumulacije i ekskrecije tvari kao i biokemijskih odgovora (Lukkari i sur., 2004).

Gujavice mogu biti izložene onečišćujućim tvarima na različite načine. Živeći u tlu u porama tla nalazi se voda u kojoj su otopljene onečišćujuće tvari s obzirom na iznimnu propusnost kože gujavica za vodu, ovaj način predstavlja glavni put ulaska onečišćujućih tvari u gujavice (Vijver i sur., 2003). Osim kroz kožu, onečišćujuće tvari ulaze u gujavice putem probave. Gujavice

ingestiraju veliku količinu tla na čije čestice mogu biti vezane onečišćujuće tvari (Morgan i sur., 2004).

Gujavice služe kao izvor hrane za brojne životinje, vodozemce, gmazove, ptice i sisavce. Stoga bioakumulacija kemijskih onečišćenja od strane gujavica implicira rizik prijenosa zagađivača na višu trofičnu razinu (Marino i sur., 1992). Zbog njihove ekološke važnosti, gujavice su korištene kao indikatori za procjenu potencijalnog utjecaja kemikalija na organizme tla (Arnold i Hodson, 2007).

2.2. Fizikalna i kemijska svojstva herbicida

U ovome radu korištena su četiri komercijalna pripravka herbicida (tablica 1).

Tablica 1. Popis pripravaka herbicida korištenih u radu

Komercijalni pripravak	Aktivni sastojak	Koncentracija aktivnog sastojka	Vrsta spoja
Laudis (Bayer d.o.o Zagreb)	Tembotrion	44 g/L	Triketon
Reglone forte (Syngenta agro d.o.o Zagreb)	Dikvat	150 g/L	Dipiridil
Boom efekt (Pinus agro d.o.o Osijek)	Glifosat	360 g/L	Aminofosfonat
Samson extra (Agro chem d.o.o Zagreb)	Nikosulfuron	60 g/L	Sulfonil-ureja

2.2.1. Tembotrion (TBT)

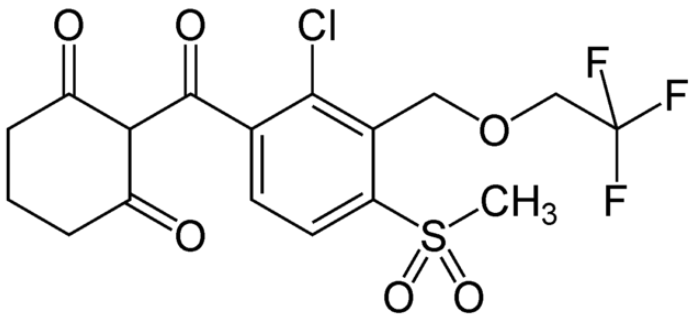
Prema kemijskoj pripadnosti tembotrion pripada grupi triketona, grupa slične kemijske strukture u kojoj dominiraju tri keto grupe, po kojoj je i dobila ime. S obzirom na fiziološke procese u biljkama pripada skupini inhibitora biosinteze karotenoida. Izaziva inhibiciju enzima hidroksi fenil piruvat deoksigenaze (HPPD). Dolazi do destrukcije klorofila, listovi su bijele ili svijetlo žute boje što rezultira blijeđenjem biljaka, zaostajanje u rastu i ugibanjem. Kod sisavaca enzim hidroksi fenil piruvat deoksigenaza sudjeluje u katabolizmu tirozina, inhibicija HPPD dovodi do povećanja koncentracije tirozina u krvi. Tembotrion najnoviji je herbicid iz skupine triketona. Na tržištu se pojavio 2007. godine pod komercijalnim nazivom Laudis (proizvođač Bayer) u obliku uljne koncentrirane suspenzije. Uvođenje supstituenta -O-CH_2-CF_3 u položaju 3 na aromatskom prstenu daje nova svojstva topljivosti molekuli čime se olakšava prolaz kroz hidrofilne i lipofilne barijere. Vrijeme poluraspada u okolišnim uvjetima je 4 do 56 dana ovisno

o tipu tla (Tarara i sur., 2009). Preporučena doza je 75-100 g ha^{-1}. Sintetički triketoni su slabo kisele molekule (pKa ~ 3,1 na 20 ° C), visoko topljive i stabilne u vodi (Dumas i sur., 2016). Tembotrion se koristi za tretiranje korova u kukuruzu. Pokazuje nisku akutnu toksičnost za oralne, dermalne i inhalacijske puteve. Pripada trećoj i četvrtog kategoriji toksičnosti (O=III, IV). Rezultati akutne toksičnosti istraživanja na štakorima, oralno LD_{50}>2000 mg/kg (O=III), dermalno LD_{50}>2000 mg/kg (O= III), inhalacijski LC_{50}>5.03 mg/L (O=IV). Rađena su istraživanja prenatalna i postnatalne osjetljivosti postoje dokazi o povećanoj osjetljivosti fetusa štakora i zečeva nakon izlaganja tembotrionu. Javlja se zastoj u rastu, sporiji razvoj kostiju te anomalije pri dozi od 1 mg/kg dnevno. Kod većih doza (100 mg/kg dnevno) dolazi do kasnih pobačaja, smanjene tjelesne težine majki i gubitka apetita (Wason 2003). Istraživanja su pokazala da tembotrion nema mutagen karakter.

Kemijska formula: $C_{17}H_{16}ClF_3O_6S$

Kemijski naziv prema IUPAC-u: 2-(2-klor-4-metilsulfonil-3-(2,2,2-trifluoroetoksimetil) benzoil)cikloheksan-l, 3-dion

Strukturna formula:



Molekularna masa: 440,814 g/mol

Topivost u vodi: 0,22mg/L (20°C pH 4);

28,3 mg/L (20°C pH 7)

29,7 mg/L (20°C pH 9)

Konstanta disocijacije: pK_a = 3,2

CAS broj: 335104-84-2

Talište: 117°C

Gustoća: 1,56 g/mL

2.2.2. Dikvat (DIQ)

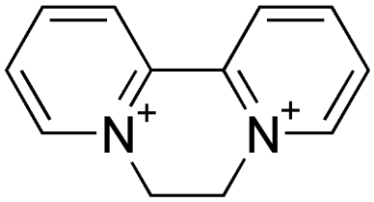
Dikvat je neselektivni kontaktni herbicid. Prema kemijskom pripadnosti pripada skupini dipiridila. Dipriridili su mala, ali vrlo značajna grupa herbicida. Odlika ove grupe je brza inaktivacija u kontaktu s tlom. Vrlo su topljivi u vodi, snažno se vežu na čestice glinasto ilovastih tala. Razgradnja se najvećim dijelom odvija uz pomoć UV zračenja, a utjecaj mikroorganizama je neznatan. S obzirom na fiziološke procese dikvat pripada grupi inhibitora fotosinteze u fotosustavu I. Ometa prijenos elektrona, dolazi do oslobađanja visoko aktivnih slobodnih radikala i razaranja stanične stijenke, iz stanice curi sadržaj i dolazi do pojave prvih (oku) vidljivih simptoma u vidu žućenja i pada turgora.

Dikvat je u kategoriji toksičnosti dva za akutnu toksičnost kože i iritaciju oka (O=II), kategoriji tri za akutnu oralnu i akutnu inhalacijsku toksičnost (O=III) i kategoriju četiri za iritaciju kože (O=IV). Dikvat se klasificira kao kancerogen skupine E.

Kemijska formula: $C_{12}H_{12}N_2$

Kemijski naziv prema IUPAC-u: 6,7-dihidrodipiriod [1,2-b:1',2'-e] pirazin-5,8-diium;dibromid

Strukturna formula:



Molekularna masa: 184,242 g/mol

Topivost u vodi: pH 5,2: 712 g/l na 20 °C

pH 7,2: 718 g/l na 20 °C

pH 9,2: 713 g/l na 20 °C

CAS broj: 85-00-7

Talište: 325°C

Gustoća: 1,22 – 1,27 na 20°C

2.2.3. Glifosat (GLF)

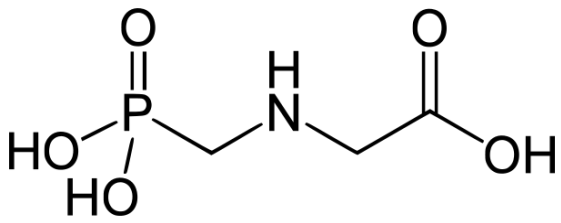
Glifosat je herbicid koji spada u skupinu aminofosfonata. U biljkama djeluje kao inhibitor EPSP sintaze. Inhibicijom enzima 5-enolipiruvil šikimat-3-fosfat sintaze sprječava se sinteza

aromatskih aminokiselina (fenilalanin, triptofan, tirozin) što zaustavlja rast, uzrokuje klorozu listova te ugibanje biljke. Glifosat je neselektivni izrazito sistemični - translokacijski pripravak. Najčešće korišteni herbicidi na globalnoj razini su upravo herbicidi na bazi glifosata. Prema istraživanjima godišnja globalna potrošnja herbicida na bazi glifosata procjenjena je na 650 000 t (Woodburn 2000). Na tržištu se pojavio u obliku koncentrata za otopinu i tableta. Herbicidi na bazi glifosata su tako široko korišteni jer su vrlo učinkoviti, neselektivno djelujući na biljke inhibirajući metabolički put koji se nalazi isključivo u biljkama i nekim mikroorganizmima (Franz i sur., 1997). Dakle, primjena glifosata teoretski ne bi trebala utjecati na životinje. Štoviše, glifosat se smatra ekološki prihvatljivim zbog svoje brze razgradnje i snažne adsorpcije na čestice tla (Vereecken 2005). Ipak, postoje dokazi da herbicidi na bazi glifosata mogu naštetiti neciljnim organizmima, osobito vodozemcima (Brühl i sur., 2013) simbiotičkim mikorizalnim gljivama i gujavicama (Pelosi i sur., 2013). Prema otrovnosti svrstan je u treću kategoriju (O=III).

Kemijska formula: $C_3H_8NO_5P$

Kemijski naziv prema IUPAC-u:N-(fosfonometil)-glicin

Strukturna formula:



Molekularna masa: 169,073 g/mol

Topivost u vodi: 10,5 g/L (pH 1,9 i 20°C)

Konstanta disocijacije: 2,34

CAS broj:1071-83-6

Talište: 189,5°C

Gustoća: 1,7 g/cm^3

2.2.4. Nikosulfuron (NCS)

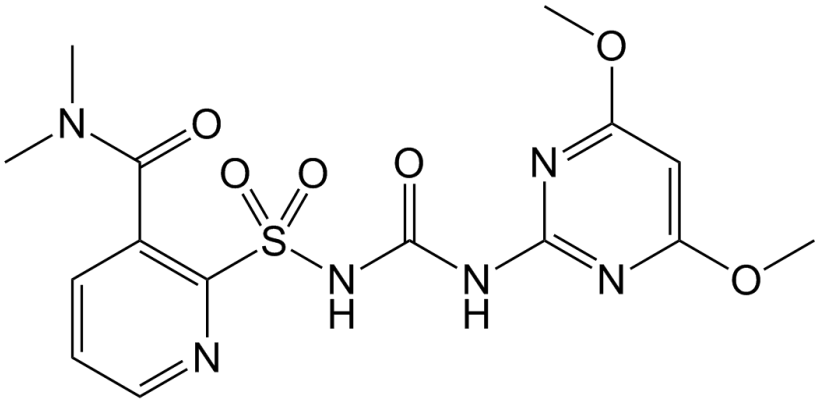
Nikosulfuron je selektivni translokacijski herbicid iz skupine sulfonil-ureja herbicida. Sulfonil ureja herbicidi su novija grupa herbicida, u praksi se nalaze od 1982. godine. U strukturi im

dominiraju sulfonil grupa i ureja, koji na svakoj strani mosta nose po jednu benzensku ili heterocikličku jezgru. S obzirom na fiziološke procese u biljkama nikosulfuron pripada grupi inhibitora acetolaktat sintaze (ALS). ALS sudjeluje u sintezi valina, izoleucina i leucina. Inhibitori ALS zaustavljaju sintezu proteina i nukleinskih kiselina te uzrokuje prestanak rasta i klorozu, nakon 1 do 4 tjedna dolazi do pojave nekroze. Čovjek i životinje ne posjeduju ovaj enzim što je i razlogom niske otrovnosti nikosulfurona za njih. Nikosulfuron je klasificiran prema otrovnosti u četvrtu kategoriju (O=IV) za oralne, inhalacijske i dermalne putove. Na osnovi bioloških testova na štakorima i miševima nije klasificiran kao kancerogen, nema mutagenih učinaka. Nema utjecaja na razvoj i reprodukciju kod štakora i zečeva. Također testovi na životinjama ne pokazuju naznake neurotoksičnosti nikosulfurona.

Kemijska formula: $C_{15}H_{18}N_6O_6S$

Kemijski naziv prema IUPAC-u: 2-[(4,6-dimetoksipirimidin-2-il)karbamilsulfamil]-N,N-dimetilpiridin-3-karboksamid

Strukturna formula:



Molekularna masa: 410, 405 g/mol

Konstanta disocijacije: 4,60

CAS broj: 111991-09-4

Talište: 172 °C

Gustoća: 9,53 g/mL

2.3. Izlaganje gujavica herbicidima

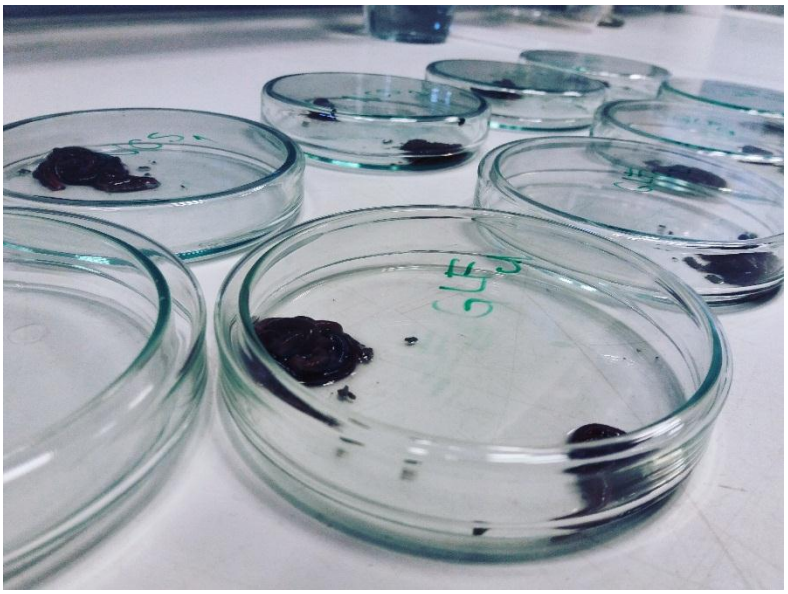
Korištene metode su tri testa toksičnosti: kontakt test sa filter papirom, test sa umjetnim tlom (OECD 1984) i reprodukcijski test (OECD 2004). Priređene su četiri okolišno relevantne koncentracije svakog herbicida (tablica 2). C_1 – 100x manja od okolišno relevantne koncentracije; C_2 – 10x manja od okolišno relevantne koncentracije; C3 – okolišno relevantna koncentracija; C_4 – 10x veća koncentracija od okolišno relevantne. Gujavice su izlagane kroz različite vremenske periode: 48h (filter papir test), 7 dana (test sa umjetnim tlom) i 28 dana (reprodukcijski test).

Tablica 2. Priprema koncentracija herbicida

Naziv herbicida	Laudis (TBT)	Reglone forte (DIQ)	Boom efekt (GLF)	Samson ekstra (NCS)
STOCK	1mL pesticida + 9mL vode	4 mL pesticida + 16 mL vode	4mL pesticida + 16 mL vode	0,4mL pesticida + 19,6 mL vode
C_1	4,5uL STOCK + 64,1 mL vode	6 uL STOCK + 64,1 mL vode	9uL STOCK + 64,1 mL vode	7,5 uL STOCK + 64,1 mL vode
C_2	45uL STOCK + 64,1 mL vode	60 uL STOCK + 64,1 mL vode	90uL STOCK + 64mL vode	75uL STOCK + 64,1 mL vode
C_3	450 uL STOCK + 63,7 mL vode	600 uL STOCKx+ 63,5 mL vode	900 uL STOCK + 63,2mL vode	750 uL STOCK + 63,4mL vode
C_4	4500 uL STOCK + 59,6 vode	6000 uL STOCK + 58,1 mL vode	9000 uL STOCK + 55,1 vode	7500 uL STOCK + 56,6mL vode

2.3.1. Kontakt test na filter papiru

Kontakt test na filter papiru je akutni test toksičnosti koji se izvodi prema OECD 207 protokolu (OECD, 1984), a princip testa se sastoji u tome da se gujavice nakon provedenog postupka čišćenja probavila, pojedinačno izlažu ispitivanoj tvari i to u staklenim posudicama ravnog dna čija se površina obloži filter papirom bez preklapanja. U kontaktnom filter papir testu zagađivalo se nanosi na filter papir, te su gujavice izložene samo dermalno. U svaku posudu stavi se jedna gujavica, posude se zatvore i stave u komoru na temperaturu od 20 ± 2°C. Napravljeno je 6 replikata po koncentraciji. Test traje 48 sati, a mortalitet se utvrđuje nakon 48 sati. Gujavice se smatraju mrtvima ako ne odgovaraju na blagi mehanički podražaj na prednjem dijelu tijela. Preživjele gujavice nakon izlaganja ostavljaju se na čišćenju u petrijevim zdjelicama odgovarajućih oznaka (slika 4).



Slika 4. Gujavice na čišćenju probavila u petrijevim zdjelicama nakon 48h izlaganja (foto: N. Stjepanović)

2.3.2. Test sa umjetnim tlom

Test s umjetnim tlom (engl. artificial soil test) akutni je test toksičnosti i izvodi se prema OECD 207 protokolu (OECD, 1984), a uključuje izlaganje gujavica testnoj tvari u umjetnom tlu u trajanju od sedam dana.

Priprema umjetnog tla uključuje miješanje sastojina umjetnog tla:

10% treseta

20% gline (udio kaolinita veći od 30%)

69% industrijskog pijeska,

1 % čini ($CaCO_3$)

Kalcijev karbonat se dodaje za podešavanje pH vrijednosti tla, potreban pH tla je 6 (±0,5). Pripremljeno tla stavljeno je u staklenke (u svaku staklenku 200g umjetnog tla). Staklenke su označene odgovarajućim oznakama i zatvorene plastičnim poklopcima s otvorima za ventilaciju (slika 5).



Slika 5 (a) i (b) Staklenke sa umjetnim tlom – foto: N. Stjepanović

Gujavice su prije postavljanja eksperimentalne postavke bile 24h na čišćenju probavila na vlažnom filter papiru. U staklenke sa umjetnim tlom umiješane su odgovarajuće koncentracije herbicida. U svaku staklenku stavljeno je po 7 gujavica. Staklenke su zatim stavljene u inkubator na 20°C na izlaganje u trajanju od sedam dana.

Nakon sedam dana preživjele gujavice su izvađene iz tla, isprane i stavljene u petrijeve zdjelice odgovarajućih oznaka te ostavljene ondje na čišćenju.

2.3.3. Reprodukcijski test

Reprodukcijski test je test toksičnosti i izvodi se prema OECD 222 protokolu (OECD, 2004), a koristi se za procjenu utjecaja kemikalija u tlu na reproduktivni uspjeh gujavica. Uključuje izlaganje gujavica testnoj tvari u umjetnom tlu u trajanju 28 dana, nakon čega se odrasle gujavice vade iz staklenki i broje se kokoni. Nakon brojanja kokoni se vraćaju u staklenke sa tlom i ostaju tako još 4 tjedna nakon čega se broje juvenilne gujavice.

Prije postavljanja eksperimenta gujavice su bile 24h na čišćenju probavila na vlažnom filter papiru. Pripremljeno je umjetno tlo.

Priprema umjetnog tla uključuje miješanje sastojina umjetnog tla:

10% treseta

20% gline (udio kaolinita veći od 30%)

69% industrijskog pijeska,

1 % čini ($CaCO_3$)

Kalcijev karbonat se dodaje za podešavanje pH vrijednosti tla, potreban pH tla je 6 (±0,5). Pripremljeno tla stavljeno je u staklenke u svaku staklenku 400 g umjetnog tla. Staklenke su označene odgovarajućim oznakama i zatvorene plastičnim poklopcima s otvorima za ventilaciju. U svaku staklenku stavljeno je 6 odraslih gujavica. Gujavice su izvagane prije

postavljanja eksperimenta i nakon 28 dana izlaganja. Rađen je po jedan replikat za svaku koncentraciju (slika 6). Uzete su tri koncentracije herbicida C_1 - 100x manja od okolišno relevantne koncentracije; C_2 – 10x manja od okolišno relevantne koncentracije; C_3 – okolišno relevantna koncentracija. C_4 koncentracija nije uzeta u obzir zbog velikog mortaliteta gujavica na toj koncentraciji u prethodnim testovima toksičnosti. Vlaga je podešena na 50%.



Slika 6. Staklenke sa umjetnim tlom za reprodukcijski test – foto: N. Stjepanović

Nakon postavljanja eksperimenta staklenke su stavljene u inkubator na 20°C na izlaganje u trajanju od 28 dana. Dan nakon izlaganja gujavice su nahranjene sa 3 g konjskog stajnjaka. Hranjenje se ponavljalo svakih 7 dana sa istom hranom. U slučajevima kad je hrane ostalo previše, dodana je samo po potrebi voda radi vlage, a hranjenje je odgođeno za 7 dana. Staklenke su svaki puta vagane radi provjere vlage.

Nakon dvadeset osam dana odrasle gujavice su izvađene iz tla, isprane i stavljene u petrijeve zdjelice odgovarajućih oznaka te ostavljene ondje na čišćenju te su brojani kokoni (slika 7).



Slika 7. Kokoni gujavice vrste *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886) – foto: N. Stjepanović

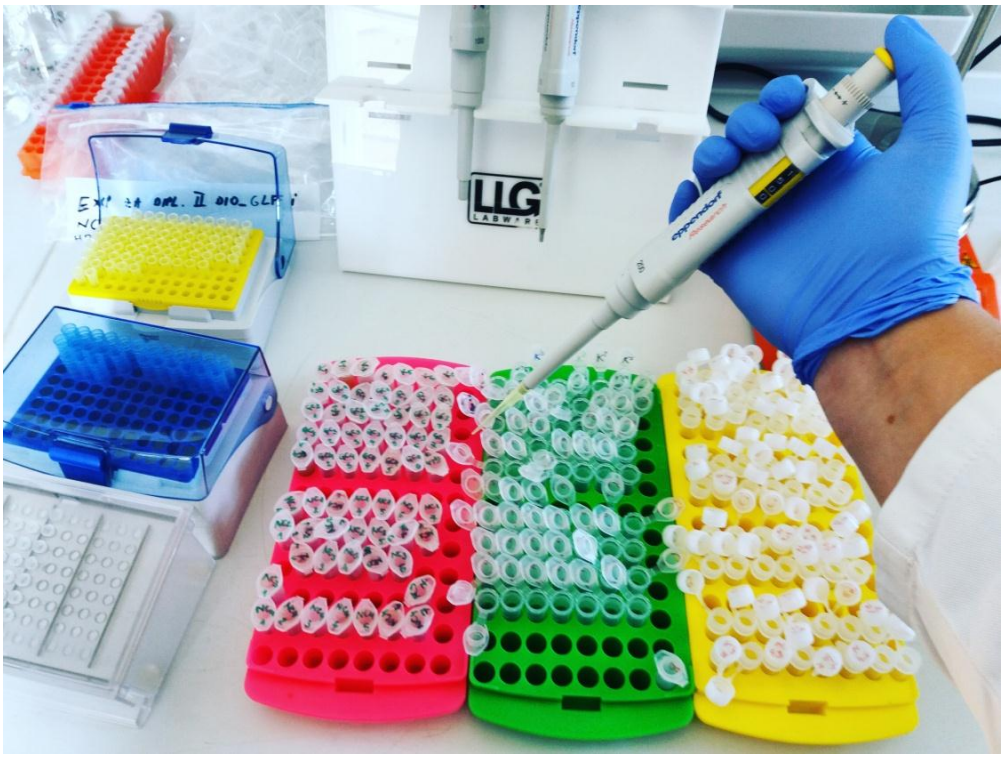
Nakon brojanja kokoni su ponovo vraćeni u staklenke sa tlom te su ostavljeni tako još 4 tjedna. Jednom tjedno provjeravana je vlaga. Nakon 4 tjedna vađene su juvenilne gujavice (slika 8).



Slika 8. Juvenilne gujavice vrste *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886.) – foto: N. Stjepanović

2.3.4. Priprema postmitohondrijske (S9) frakcije

Nakon izlaganja i čišćenja gujavica kod sva tri testa toksičnosti, priprema se postmitohondrijska ili S9 frakcija. Gujavice su izvagane i homogenizirane u fosfatnom puferu (pH=7,2) u omjeru 1:5 (masa tkiva : volumen pufera). Nakon homogeniziranja homogenata centrifugirali 30 minuta na 9000 x g na +4°C. Nakon centrifugiranja odvajanje supernatanta odnosno S9 frakcije u Eppendorf epruvetice na – 80°C do analize (slika 9).



Slika 9. Pohranjivanje uzoraka u eppendorf epruvetice nakon centrifugiranja – foto: N. Stjepanović

2.4. Mjerenje aktivnosti

Nakon izlaganja gujavica u trajanju od 48h (filter papir test), 7 dana (test sa umjetnim tlom) i 28 dana (reprodukcijski test) pripremljena je postmitohondrijska frakcija preživjelih gujavica te su mjerene aktivnosti tri molekularna biomarkera: acetilkolin esteraze (AChE), katalaze (CAT) i glutation-S-transferaze (GST) te je određena količina proteina.

2.4.1. Acetilkolin esteraza (AChE)

Mjerena je aktivnost acetilkolin esteraze metodom prema Elliman i sur. (1961) u S9 frakciji homogenata gujavica. Mjerenje se zasniva na slijedećem principu: acetiltiokolin (ATCh) se enzimatski hidrolizira pri čemu nastaje acetat i tiokolin. Nastali tiokolin reagira sa Ellmanovim reagensom 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom (DTNB), a kao produkt nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB).

acetilkolin → tiokolin + acetat

tiokolin + ditiobisnitrobenzoat → anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline

Reakcija se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH. Maksimum apsorbance TNB je na 412 nm. Volumen reakcijske smjese iznosio je 1,5 mL od čega 1,4 mL fosfatnog pufera (0,1 M, pH=7.2), 25 µL DTNB, 40 µL S9 i 35 µL acetiltiokolin jodida. Apsorbancija je mjerena na 412 nm u staklenoj kiveti tijekom 30 sekundi. Referentna kiveta sadrži samo fosfatni pufer.

2.4.2. Katalaza (CAT)

Aktivnost katalaze mjerena metodom prema Claiborne i sur., (1985). Metoda se zasniva na mjerenju razgradnje vodikovog peroksida, odnosno prati se opadanje apsorbancije tijekom 30 sekundi na 240 nm.

(katalitička aktivnost) $H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$

Mjerenje se vrši u kvarcnoj kiveti, ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 1,5 mL od čega 780 µL fosfatnog pufera (0,1 M, pH=7,2), 20 µL S9 i 700 µL H_2O_2. Referentna kiveta sadrži samo fosfatni pufer.

2.4.3. Glutation-S-transferaza (GST)

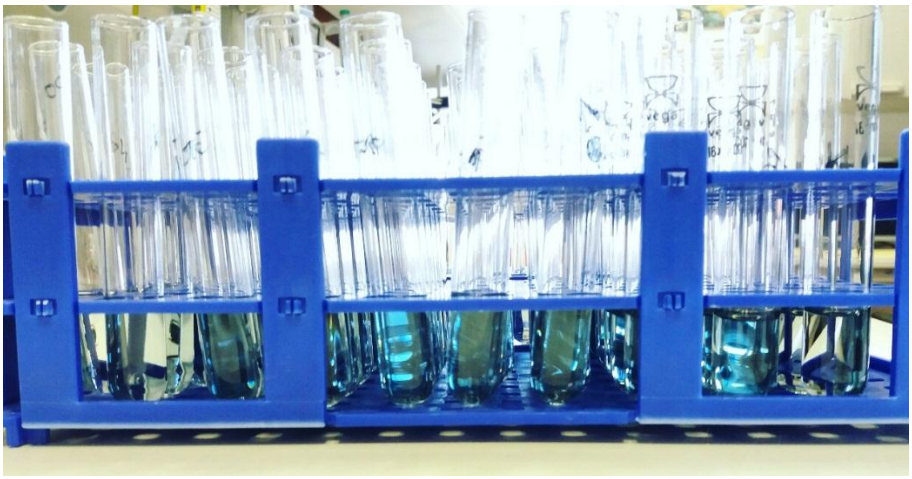
Aktivnost glutation S-transferaze (GST) mjerena je metodom prema Habigu i sur., (1974). Princip metode zasniva se na sljedećem: GST katalizira konjugaciju L-glutationa sa 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) kroz tiolnu skupini L-glutationa.

GSH + CDNB → GS-DNB konjugat + HCl

Brzina porasta apsorbancije direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku. Mjerenje se vrši u kvarcnoj kiveti na 340 nm tijekom 30 sekundi. Ukupni volumen reakcijske smjese je 1,5 mL od čega 1 mL CDNB, 250 µl GSH i 25µl S9. Referentna kiveta sadrži samo fosfatni pufer.

2.4.4. Proteini

Proteini su određivani metodom prema Lowry-u (1951). Metoda prema Lowry-u temelji se na reakciji bakrenih iona vezanih na amino skupinu peptidne veze i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline Tyr u proteinu sa Folin-Ciocalteau reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja (slika 10) sa apsorpcijskim maksimumom pri 750nm.



Slika 10. Kompleks plavo-ljubičastog obojenja prilikom dobivanja proteina metodom prema Lowry- u – foto: N. Stjepanović

2.5. Statistički obrada podataka

Podatci su analizirani koristeći statistički softver R verzija 3.4.0 (R Core Team 2016). Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilk-sovim testom. Ovaj test testira nultu hipotezu da je distribucija podataka normalna. Za testiranje homogenosti varijanci korišten je Barlett-ov test. On se može primijeniti samo ako su podatci normalno distribuirani. S obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. One-way ANOVA) za utvrđivanje razlika između različitih skupina uzoraka gdje postoji samo jedna nezavisna varijabla u podatcima. Analizom varijance moguće je ustvrditi postoji li razlika između različitih uzoraka, međutim ANOVA ne pokazuje između kojih uzoraka ta razlika postoji. Iz tog izvode se post hoc testovi, testovi višestruke usporedbe. Korišten je Dunett-ov test koji predstavlja modificirani t-test koji je dizajniran za uspoređivanje svake eksperimentalne skupine sa kontrolnom skupinom. Pri ovakvoj analizi broj usporedbi je značajno manji pa se ovaj test smatra pri ovakvom dizajnu eksperimenta snažnijim u odnosu na ostale. Ovaj test također zahtjeva podjednake veličine uzoraka po skupinama. Grafički prikazi izrađeni su u programu Excel 2016 (MS Office 2016).

3. REZULTATI

3.1. Tembotrion (TBT)

U tablici 3. prikazan je broj preživjelih gujavica nakon izlaganja tembotrionu 48h i 7 dana. Kod kratkotrajnog izlaganja (48h) broj gujavica po koncentraciji na početku eksperimenta bio je šest. Mortalitet je zabilježen samo na C_4 koncentraciji (10x veća od okolišno relevantne). Kod izlaganja u trajanju od sedam dana broj gujavica na početku eksperimenta je bio sedam po koncentraciji, mortalitet nakon izlaganja tembotrionu zabilježen je samo na C_4 koncentraciji.

Tablica 3. Broj preživjelih gujavica nakon izlaganja tembotrionu

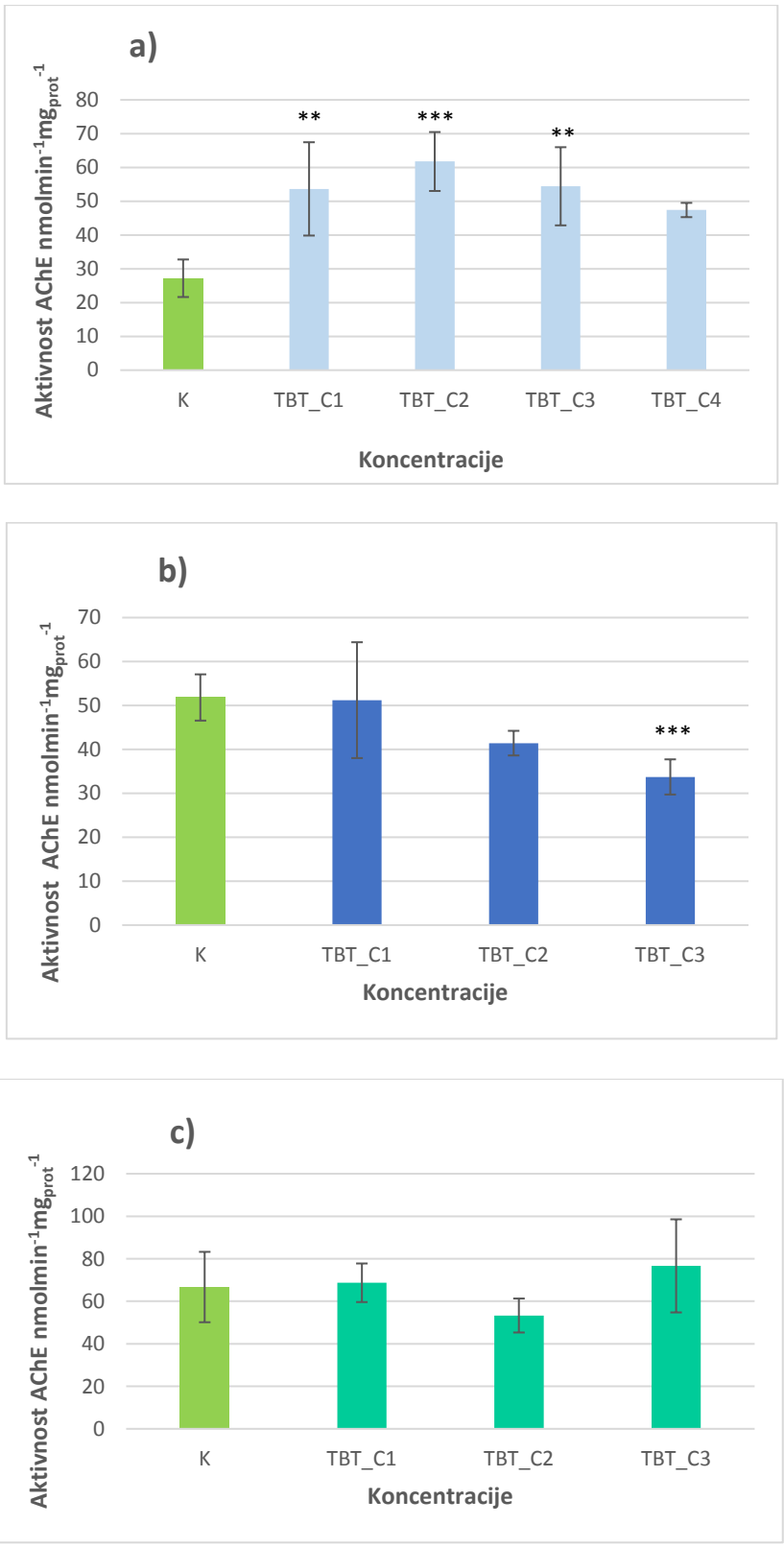
	48h	7 dana
C_1	6	7
C_2	6	7
C_3	6	7
C_4	2	0

3.1.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja tembotrionu 48 h, 7 dana, 28 dana

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE nakon izlaganja tembotrionu prikazani su na slici 11. Na slici 11 (a) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja tembotrionu 48h. Iz rezultata je vidljiva razlika aktivnosti enzima pri različitim koncentracijama. Između kontrole i svih koncentracija vidljiva je statistički značajna razlika ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (53,66 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_2$ (61,76 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_3$ (54,43 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_4$ (47,40 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 11 (b) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja tembotrionu 7 dana. Iz rezultata je vidljiva razlika u aktivnosti enzima pri različitim koncentracijama. Statistički značajna razlika vidljiva je samo između C_3 koncentraciji u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (51,21 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_2$ (41,42 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_3$ (33,73 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 11 (c) vidimo prikaz aktivnosti AChE nakon izlaganja tembotironu 28 dana. Nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (68,70 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_2$ (53,30 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_3$ (76,65 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).



Slika 11. Aktivnost AChE nakon izlaganja tembotrionu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

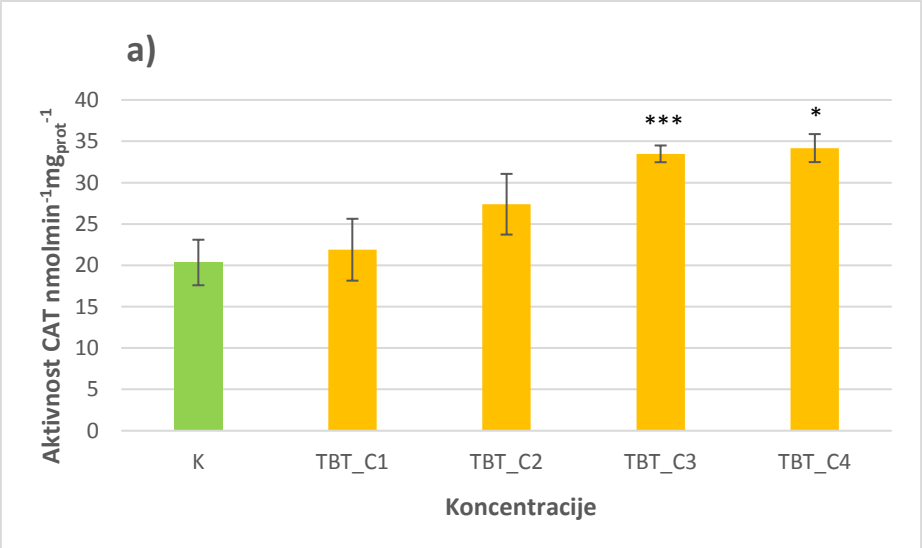
3.1.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja tembotrionu 48h, 7 dana, 28 dana

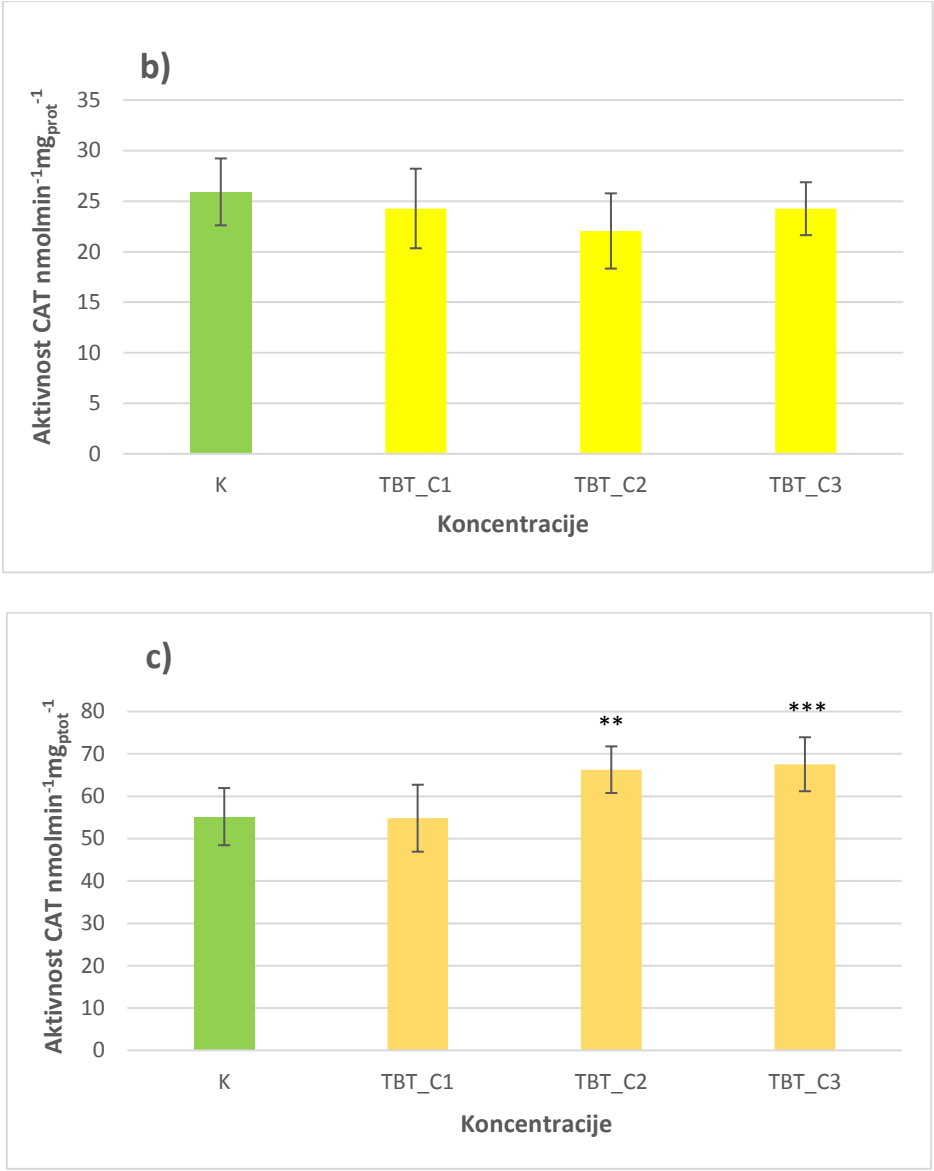
Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze nakon izlaganja tembotrionu prikazani su na slici 12. Na slici 12 (a) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja tembotrionu 48h. Iz rezultata je vidljiva

je statistički značajna razlika ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu pri C_3 i C_4 koncentraciji. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (21,89 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_2$ (27,38 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_3$ (33,48 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_4$ (34,17 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 12 (b) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja tembotrionu 7 dana. Iz rezultata nije vidljiva statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (24,08 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_2$ (18,54 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_3$ (21,36 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 12 (c) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja tembotrionu 28 dana. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika koncentracije C_2 i C_3 u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (54,81 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_2$ (66,27 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), TBT_$C_3$ (67,56 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).





Slika 12. Aktivnost CAT nakon izlaganja tembotrionu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

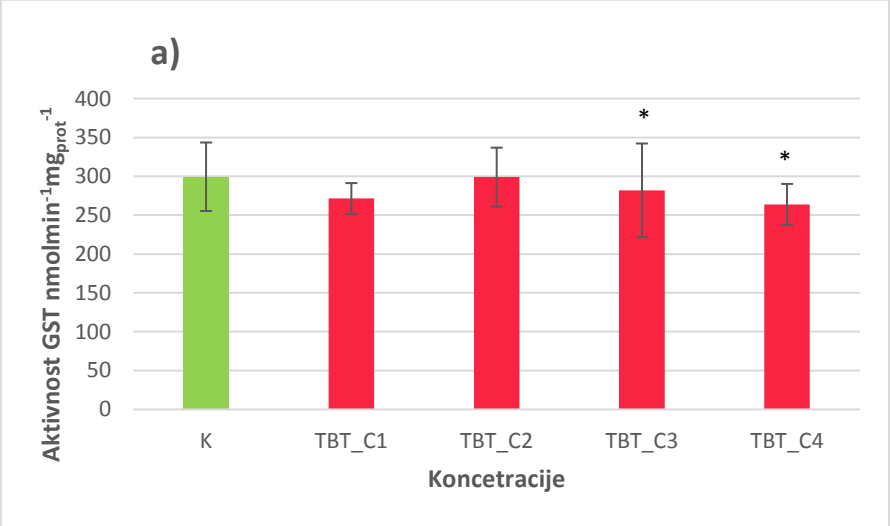
3.1.3. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) nakon izlaganja tembotrionu 48 h, 7 dana, 28 dana

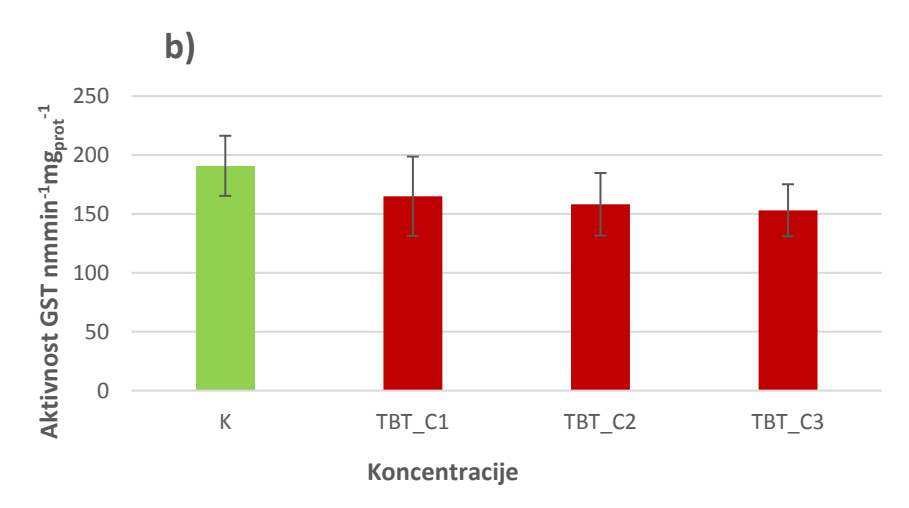
Rezultati mjerenja aktivnosti glutation-S-transferaze nakon izlaganja tembotrionu prikazani su na slici 13. Na slici 13 (a) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja tembotrionu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika C_3 i C_4 koncentracije u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (271,39 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_2 (299,03 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_3 (281,98 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_4 (263,90 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

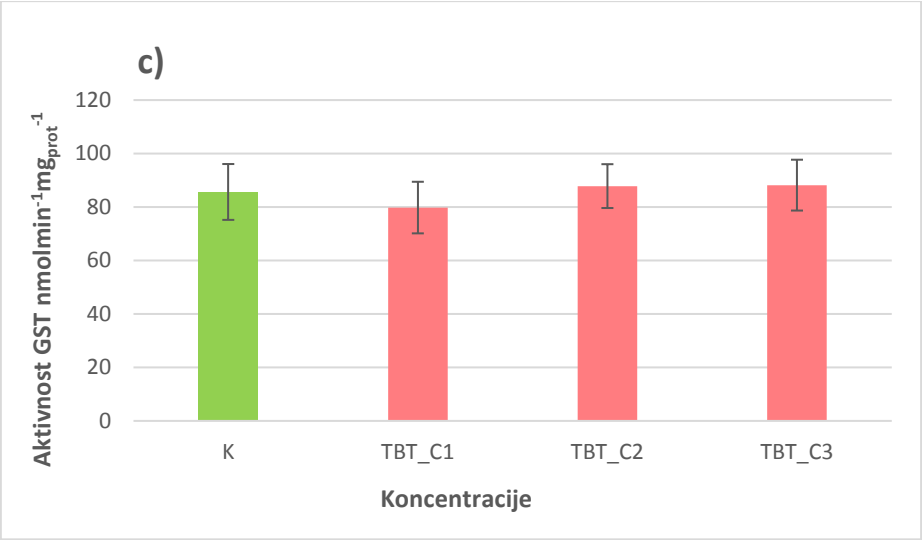
Na slici 13 (b) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja tembotrionu 7 dana. Nije vidljiva statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost

za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (164,99 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_2 (158,14 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_3 (153,09 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

Na slici 13 (c) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja tembotrionu 28 dana. Nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti TBT_C_1 (79,79 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_2 (87,83 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), TBT_C_3 (88,19 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).







Slika 13. Aktivnost GST nakon izlaganja tembotrionu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

3.2. Dikvat (DIQ)

U tablici 4. prikazan je broj preživjelih gujavica nakon izlaganja dikvatu 48h i 7 dana. Kod kratkotrajnog izlaganja (48h) broj gujavica po koncentraciji na početku eksperimenta bio je šest. Mortalitet je zabilježen samo na C_3 i C_4 koncentraciji. Kod izlaganja u trajanju od sedam dana broj gujavica na početku eksperimenta je bio sedam po koncentraciji, mortalitet nakon izlaganja tembotrionu zabilježen je ponovo na C_3 i C_4 koncentraciji.

Tablica 4. Broj preživjelih gujavica nakon izlaganja dikvatu

	48h	7 dana
C_1	6	7
C_2	6	7
C_3	5	0
C_4	0	1

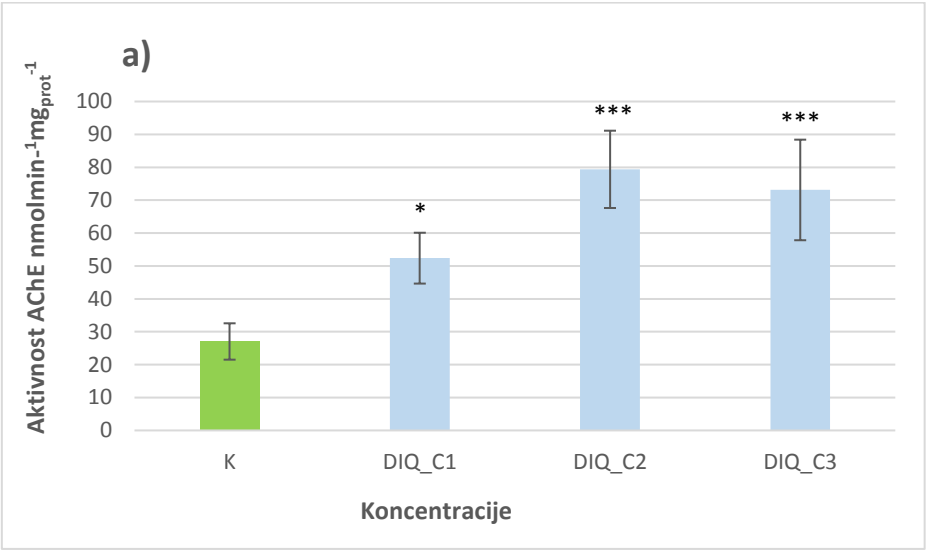
3.2.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja dikvatu 48h, 7 dana, 28 dana

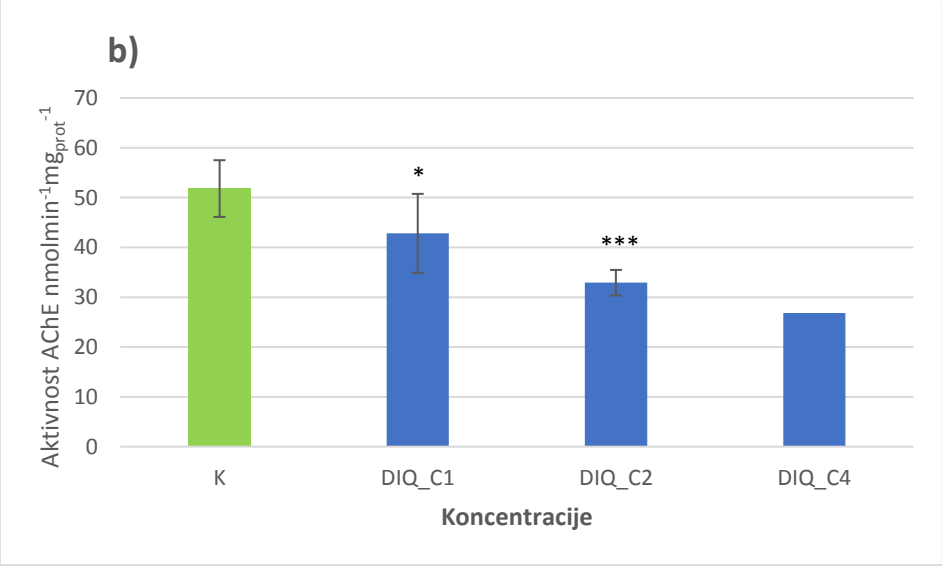
Rezultati mjerenja aktivnosti AChE nakon izlaganja dikvatu prikazani su na slici 14. Na slici 14 (a) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja dikvatu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika ($p<0,05$) svih uzoraka u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (52,37 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (79,37 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_3$ (73,11 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

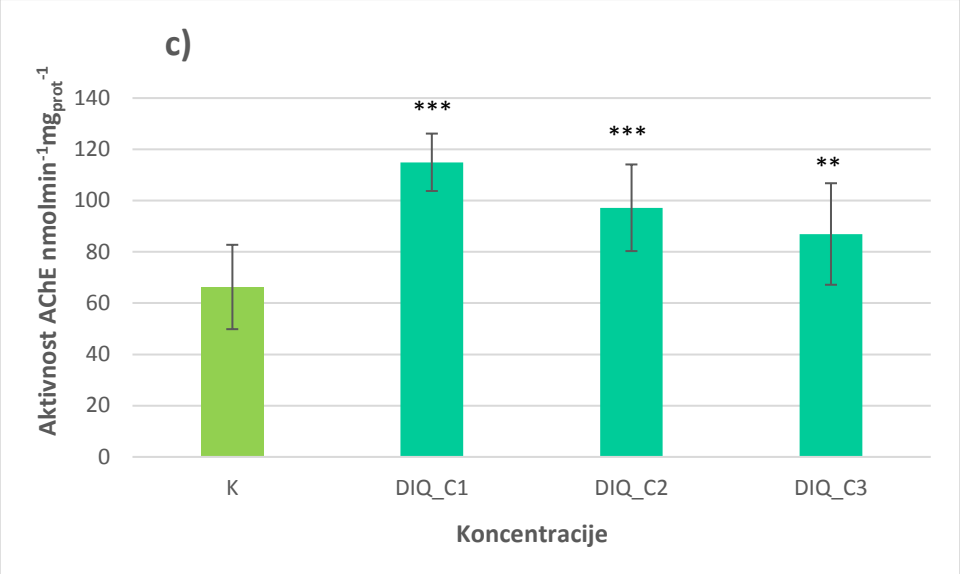
Na slici 14 (b) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja dikvatu 7 dana. Vidljiva je statistički značajna razlika između kontrole i C_1 te kontrole i C_2 koncentracije ($p<0,05$).

Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (42,83 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), DIQ_C_2 (32,92 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), DIQ_C_4 (26,83 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

Na slici 14 (c) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja dikvatu 28 dana. Vidljiva je statistički značajna razlika između svih koncentraciju u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (114, 95 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), DIQ_C_2 (97,21 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), DIQ_C_3 (86,96 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).







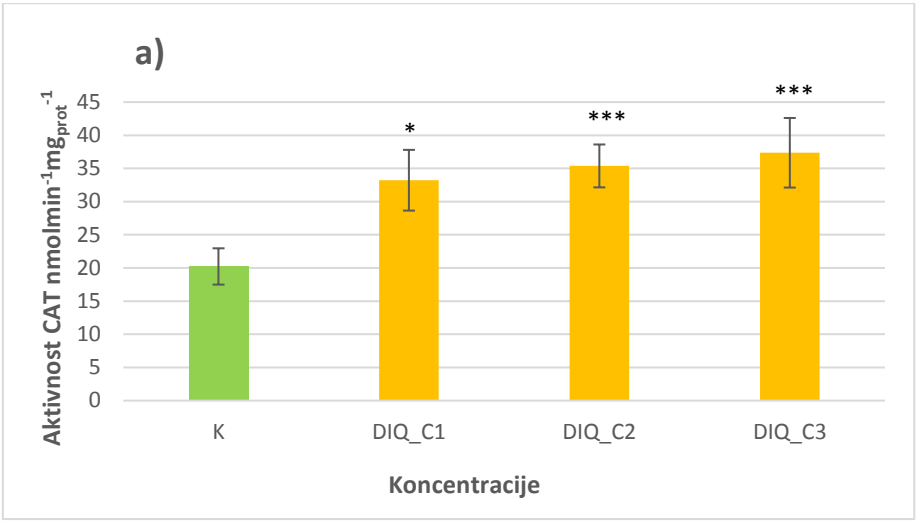
Slika 14. Aktivnost AChE nakon izlaganja dikvatu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

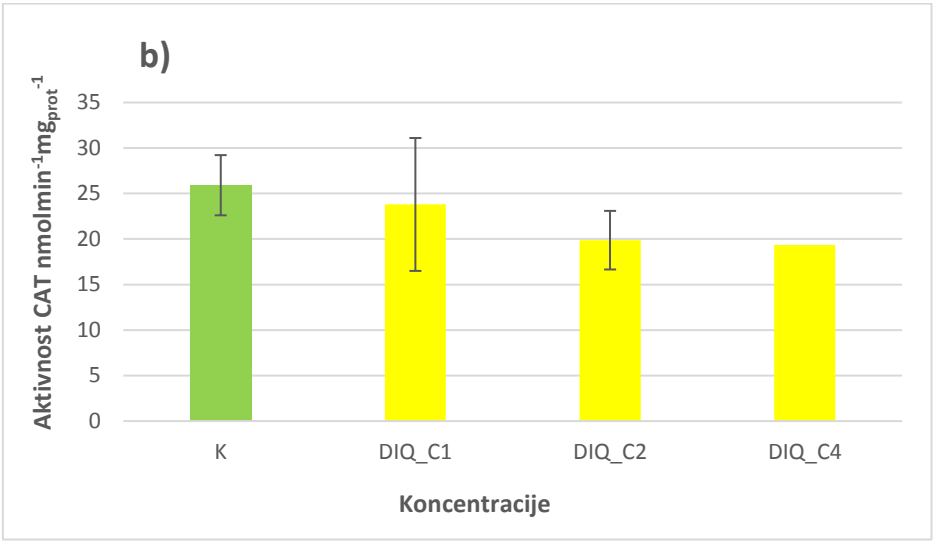
3.2.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja dikvatu 48h, 7 dana, 28 dana

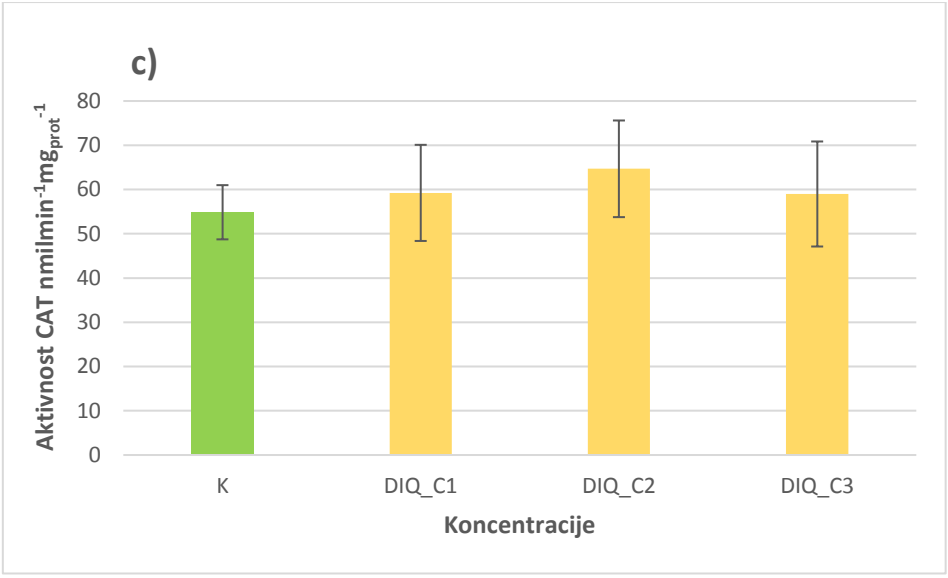
Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze nakon izlaganja dikvatu prikazani su na slici. Na slici 15 (a) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja dikvatu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika ($p<0,05$) svih uzoraka u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (33,22 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (35,37 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_3$ (37,35 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 15 (b) prikazana je aktivnost katalaze nakon izlaganja dikvatu 7 dana. Nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (23,80 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (19,87 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_4$ (19,35 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 15 (c) prikazana je aktivnost katalaze nakon izlaganja dikvatu 28 dana. Nije vidljiva statistički značajna razlika između koncentracije i kontrole. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (23,80 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (19,87 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_4$ (19,35 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).







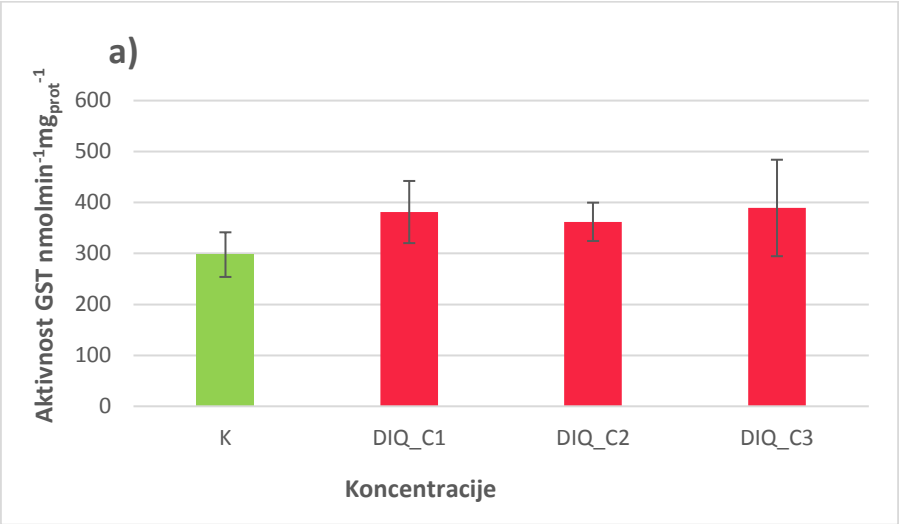
Slika 15. Aktivnost CAT nakon izlaganja dikvatu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

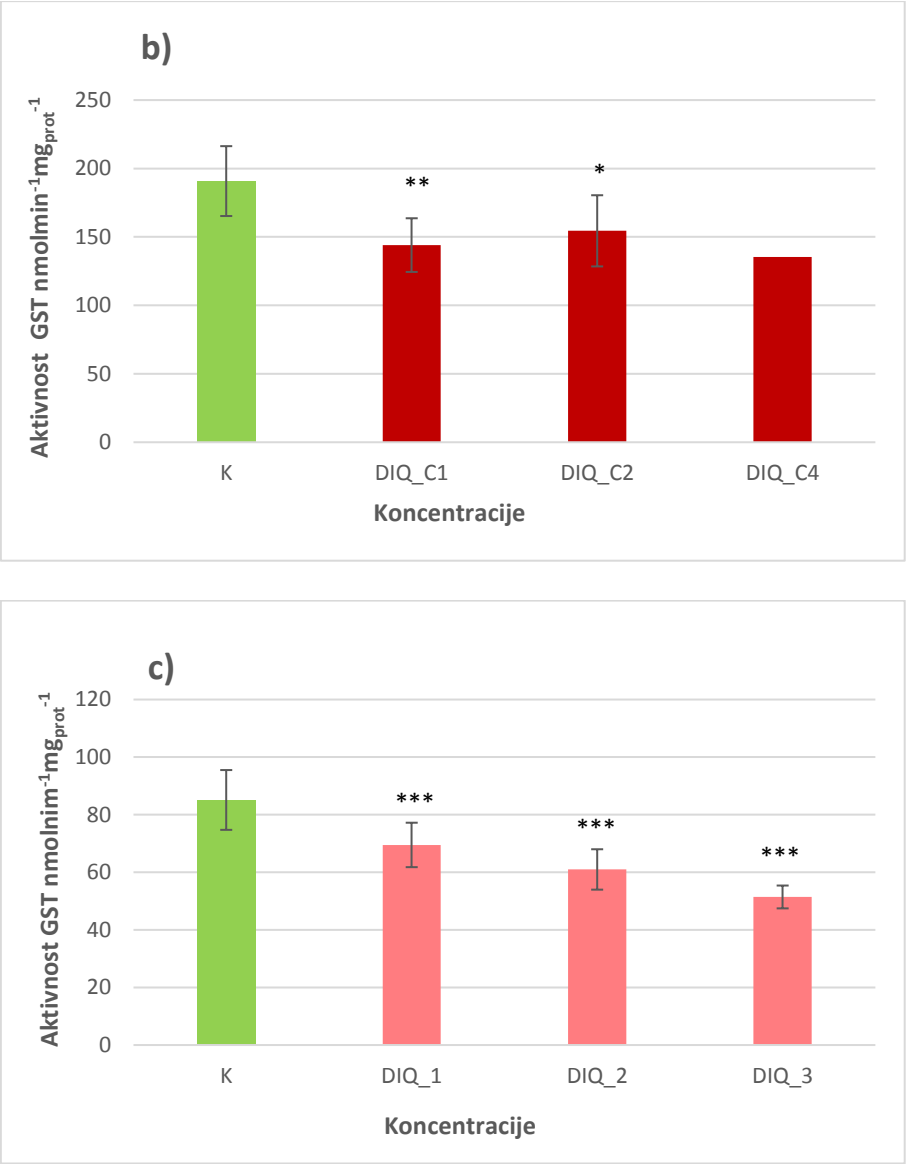
3.2.3.Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) nakon izlaganja dikvatu 48h, 7 dana, 28 dana

Rezultati mjerenja aktivnosti glutation-S-transferaze nakon izlaganja dikvatu prikazani su na slici 16. Na slici 16 (a) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja dikvatu 48h. Iz rezultata nije vidljiva statistički značajna razlika koncentracija u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (381,25 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (362,06 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_3$ (389,23 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 16 (b) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja dikvatu 7 dana. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između kontrole i C_1 te kontrole i C_2 ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (144,04 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (154,47 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_4$ (135,39 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 16 (c) prikazana je aktivnost glutation-S-transferaze nakon izlaganja dikvatu 28 dana. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika svih uzoraka u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti DIQ_C_1 (69,50 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_2$ (60,68 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), DIQ_$C_3$ (51,44 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).





Slika 16. Aktivnost GST nakon izlaganja dikvatu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

3.3. Glifosat (GLF)

U tablici 5. prikazan je broj preživjelih gujavica nakon izlaganja glifosatu 48h i 7 dana. Kod kratkotrajnog izlaganja (48h) broj gujavica po koncentraciji na početku eksperimenta bio je šest. Kod izlaganja u trajanju od sedam dana broj gujavica na početku eksperimenta je bio sedam po koncentraciji. Mortalitet nije zabilježen.

Tablica 5. Broj preživjelih gujavica nakon izlaganja glifosatu

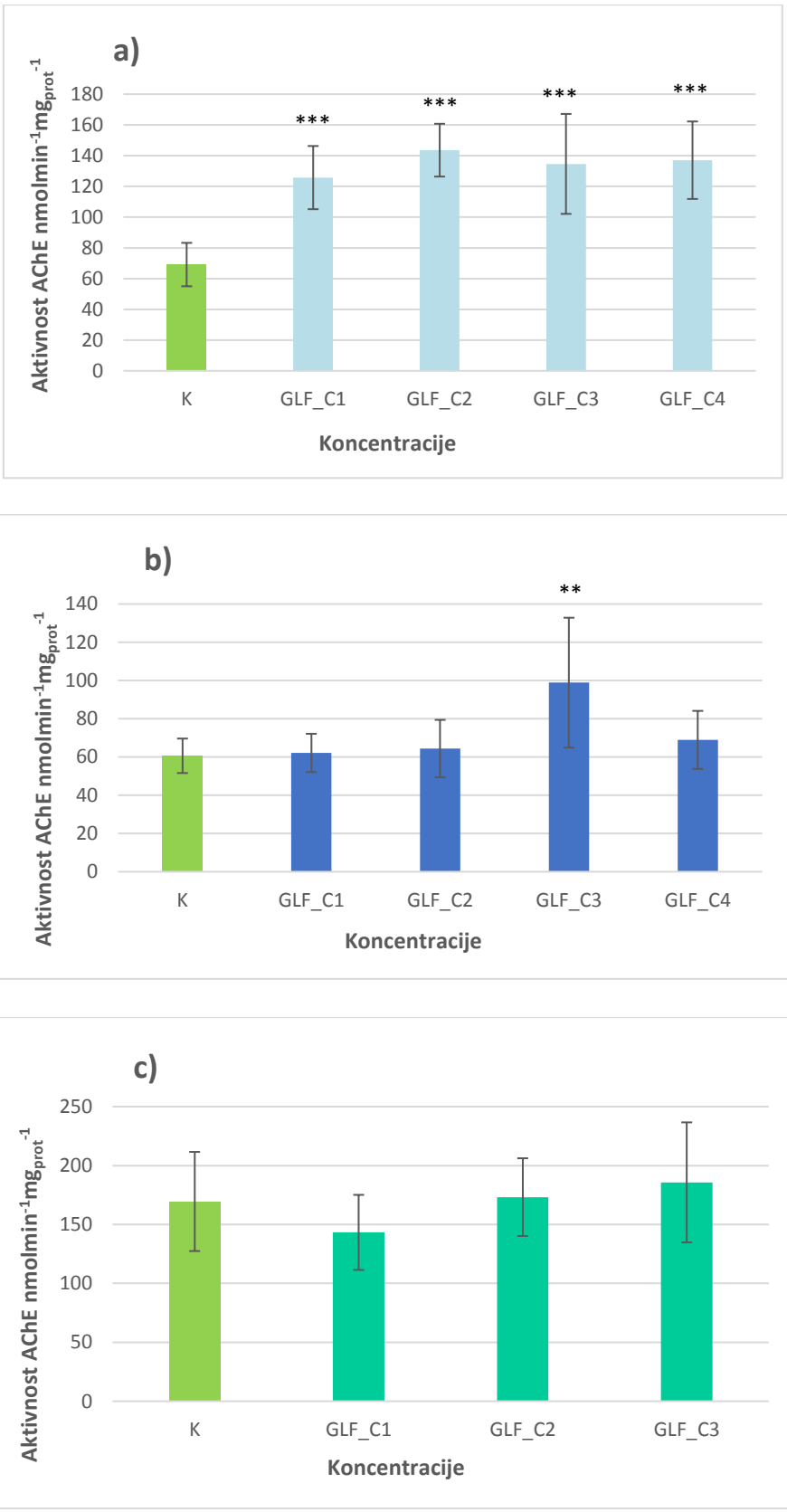
	48h	7 dana
C_1	6	7
C_2	6	7
C_3	6	7
C_4	6	7

3.3.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja glifosatu 48h, 7 dana, 28 dana

Rezultati mjerenja aktivnosti AChE nakon izlaganja glifosatu prikazani su na slici 17. Na slici 17 (a) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja glifosatu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika svih uzoraka u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C_1 (125,72 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_2$ (143,55 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_3$ (134,63 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_4$ (137,05 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 17 (b) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja glifosatu 7 dana. Statistički značajna razlika vidljiva je samo između kontrole i C_3 koncentracije ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C_1 (62,13 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_2$ (64,39 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_3$ (98,89 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_4$ (64,44 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 17 (c) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja glifosatu 28 dana. Nije vidljiva statistički značajna razlika između uzoraka i kontrole. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C_1 (143, 27 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_2$ (173,21 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_3$ (185,71 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).



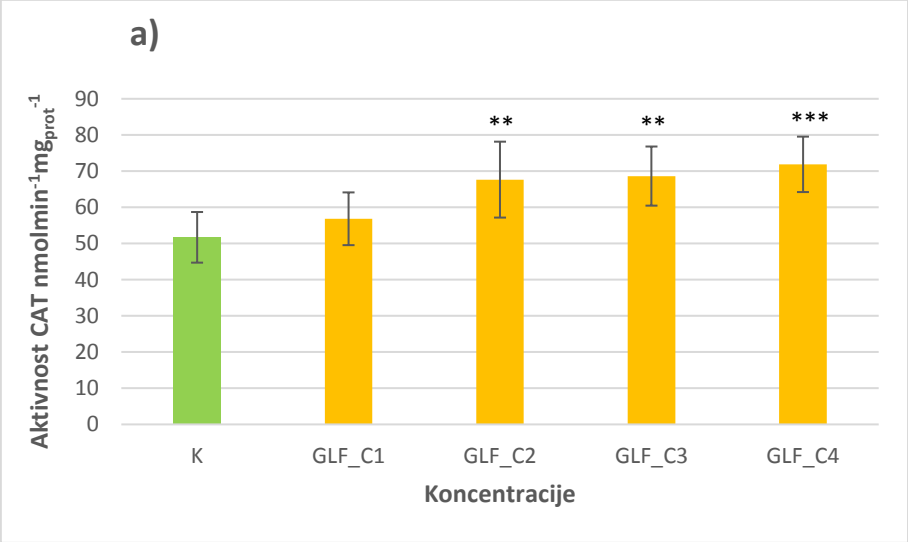
Slika 17 Aktivnost AChE nakon izlaganja glifosatu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

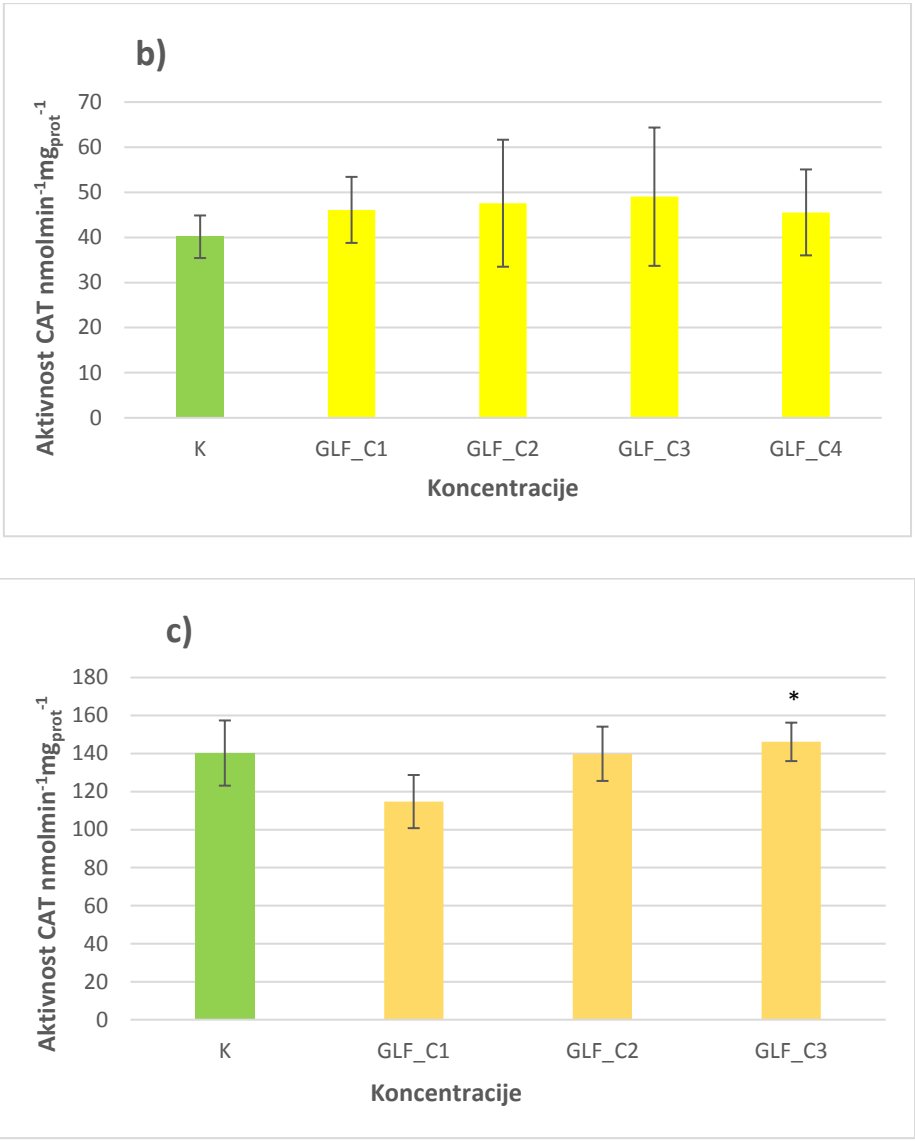
3.3.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja glifosatu 48h, 7 dana, 28 dana

Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze nakon izlaganja glifosatu prikazani su na slici 18. Na slici 18 (a) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja glifosatu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između C_2, C_3, i C_4 koncentracija u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C_1 (56,84 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_2$ (67,66 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_3$ (68,63 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_4$ (71,88 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 18 (b) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja glifosatu 7 dana. Nema statistički značajne razlike u odnosu uzoraka i kontrole. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C_1 (45,09 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_2$ (47,58 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_3$ (49,03 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_4$ (45,54 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 18 (c) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja glifosatu 28 dana. Statistički značajna razlika utvrđena je između C_3 koncentracije i kontrole ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C_1 (114,75 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_2$ (139,89 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), GLF_$C_3$ (146,19 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).





Slika 18. Aktivnost CAT nakon izlaganja glifosatu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

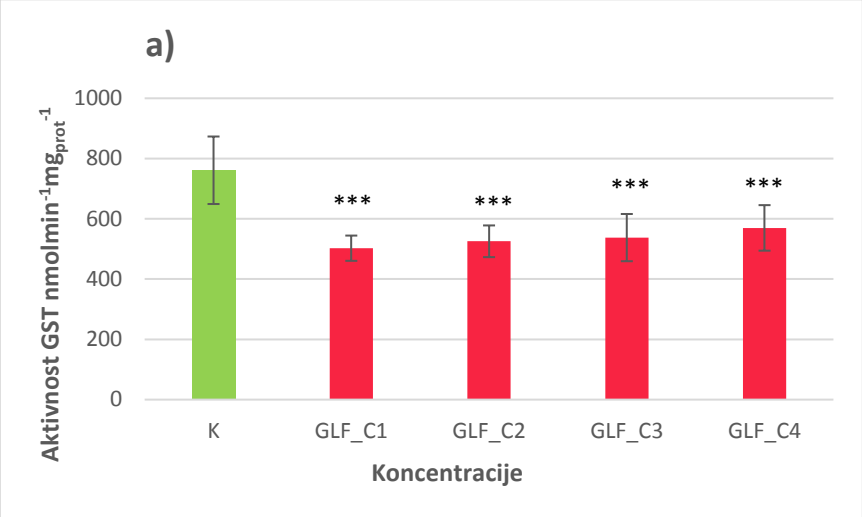
3.3.3. Aktivnost glutation-S-trensferaze nakon izlaganja glifosatu 48h, 7 dana, 28 dana

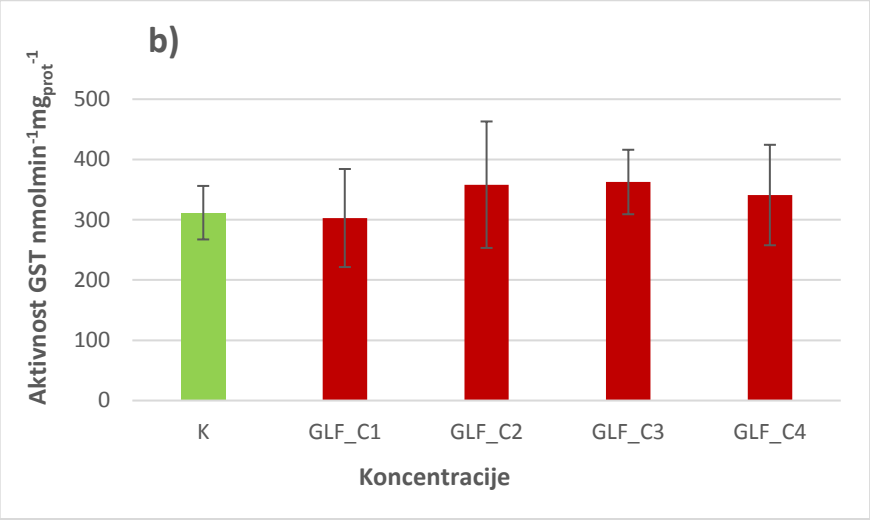
Rezultati mjerenja aktivnosti glutation-S-transferaze nakon izlaganja glifosatu prikazani su na slici 19. Na slici 19 (a) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja glifosatu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika svih koncentracija u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C$_1$ (502,74 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_2$ (560,35 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_3$ (499,88 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_4$ (504, 86 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

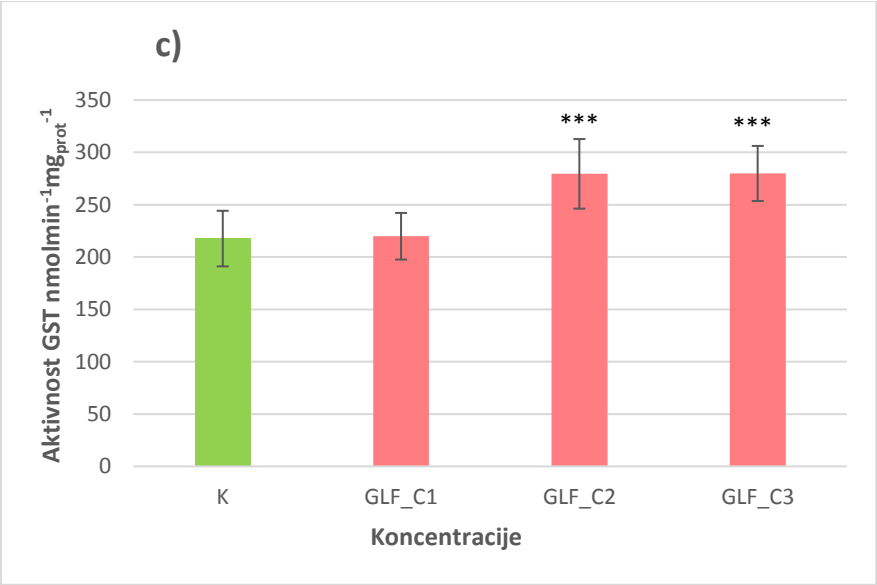
Na slici 19 (b) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja glifosatu 7 dana. Nema statistički značajne razlike između uzoraka i kontrole. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C$_1$ (302,86 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_2$

(358,16 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_3$ (362,64 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_4$ (340,99 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

Na slici 19 (c) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja glifosatu 28 dana. Vidljiva je statistički značajne razlike između C$_3$ i C$_4$ koncentracije u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti GLF_C$_1$ (219,90 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_2$ (279,51 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), GLF_C$_3$ (279,80 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).







Slika 19. Aktivnost GST nakon izlaganja glifosatu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

3.4. Nikosulfuron (NCS)

U tablici 6. prikazan je broj preživjelih gujavica nakon izlaganja nikosulfuronu 48h i 7 dana. Kod kratkotrajnog izlaganja (48h) broj gujavica po koncentraciji na početku eksperimenta bio je šest. Mortalitet je zabilježen samo na C_4 koncentraciji (10x veća od okolišno relevantne). Kod izlaganja u trajanju od sedam dana broj gujavica na početku eksperimenta je bio sedam po koncentraciji, nema zabilježenog mortaliteta.

Tablica 6. Broj preživjelih gujavica nakon izlaganja nikosulfuronu

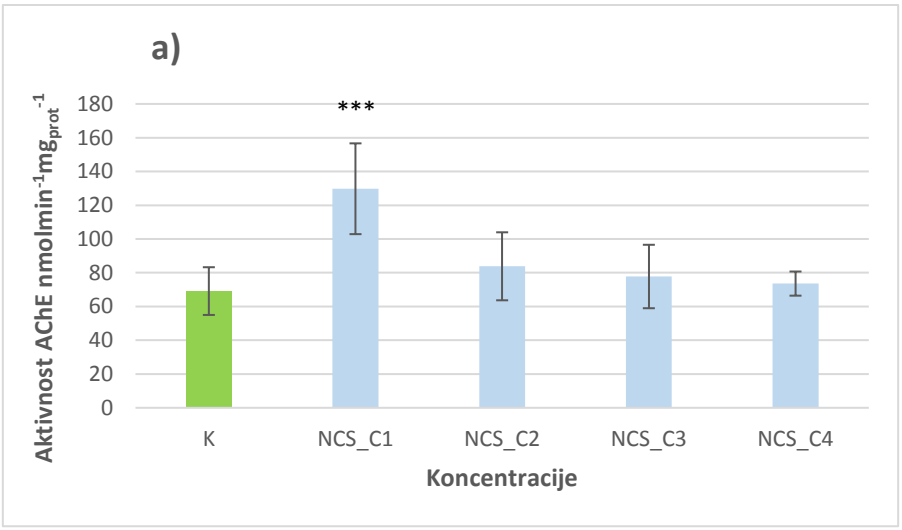
	48h	**7 dana**
C_1	6	7
C_2	6	7
C_3	6	7
C_4	3	7

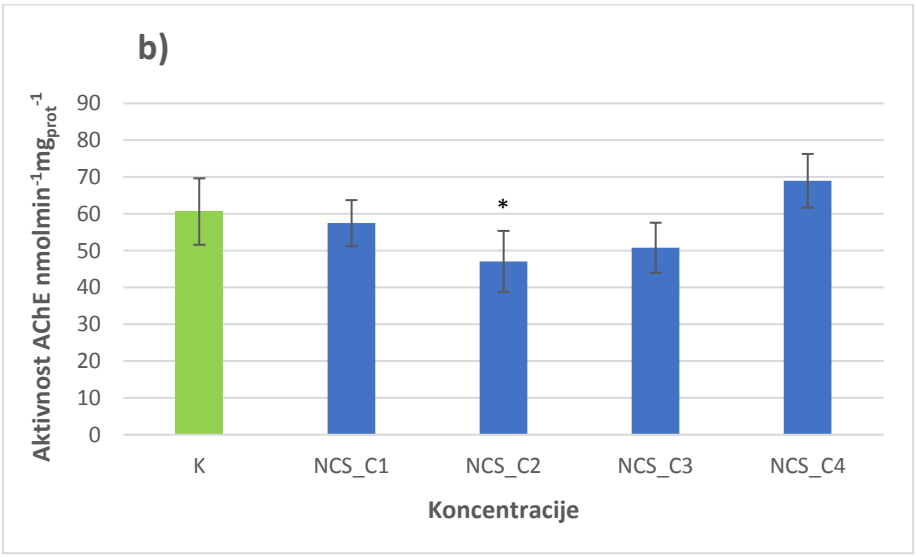
3.4.1. Aktivnost acetilkolin esteraze (AChE) nakon izlaganja nikosulfuronu 48h, 7 dana, 28 dana

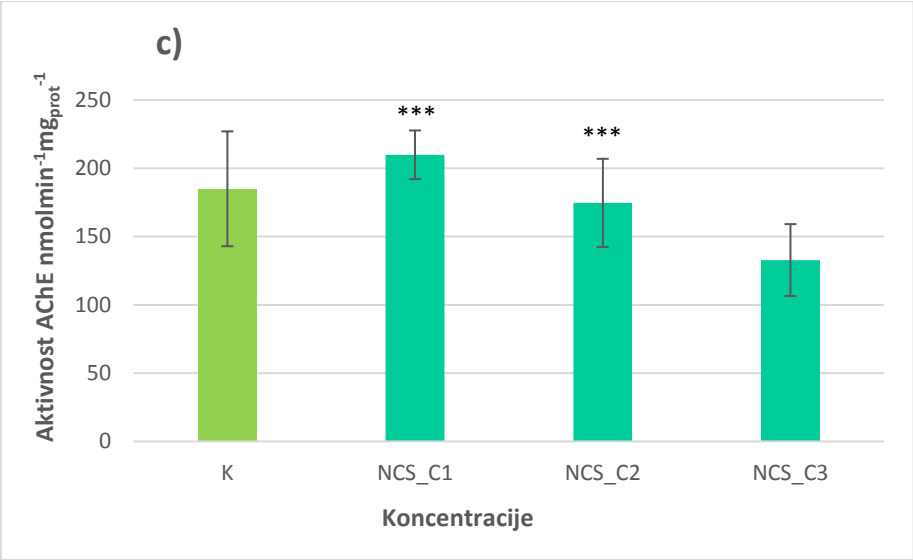
Rezultati mjerenja aktivnosti AChE nakon izlaganja nikosulfuronu prikazani su na slici 20. Na slici 20 (a) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja nikosulfuronu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika samo C_1 koncentracije u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (129,76 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_2$ (83,82 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_3$ (77,77 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_4$ (73,58 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 20 (b) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja nikosulfuronu 7 dana. Iz rezultata vidljiva je statistički značajna razlika samo C_2 koncentracije u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (57,48 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_2 (47,07 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_3 (50,79 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_4 (68,97 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

Na slici 20 (c) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja nikosulfuronu 28 dana. Statistički značajna razlika vidljiva je između C_1 i C_2 koncentracije u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (209,95 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_2 (174,68 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_3 (132,84 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).







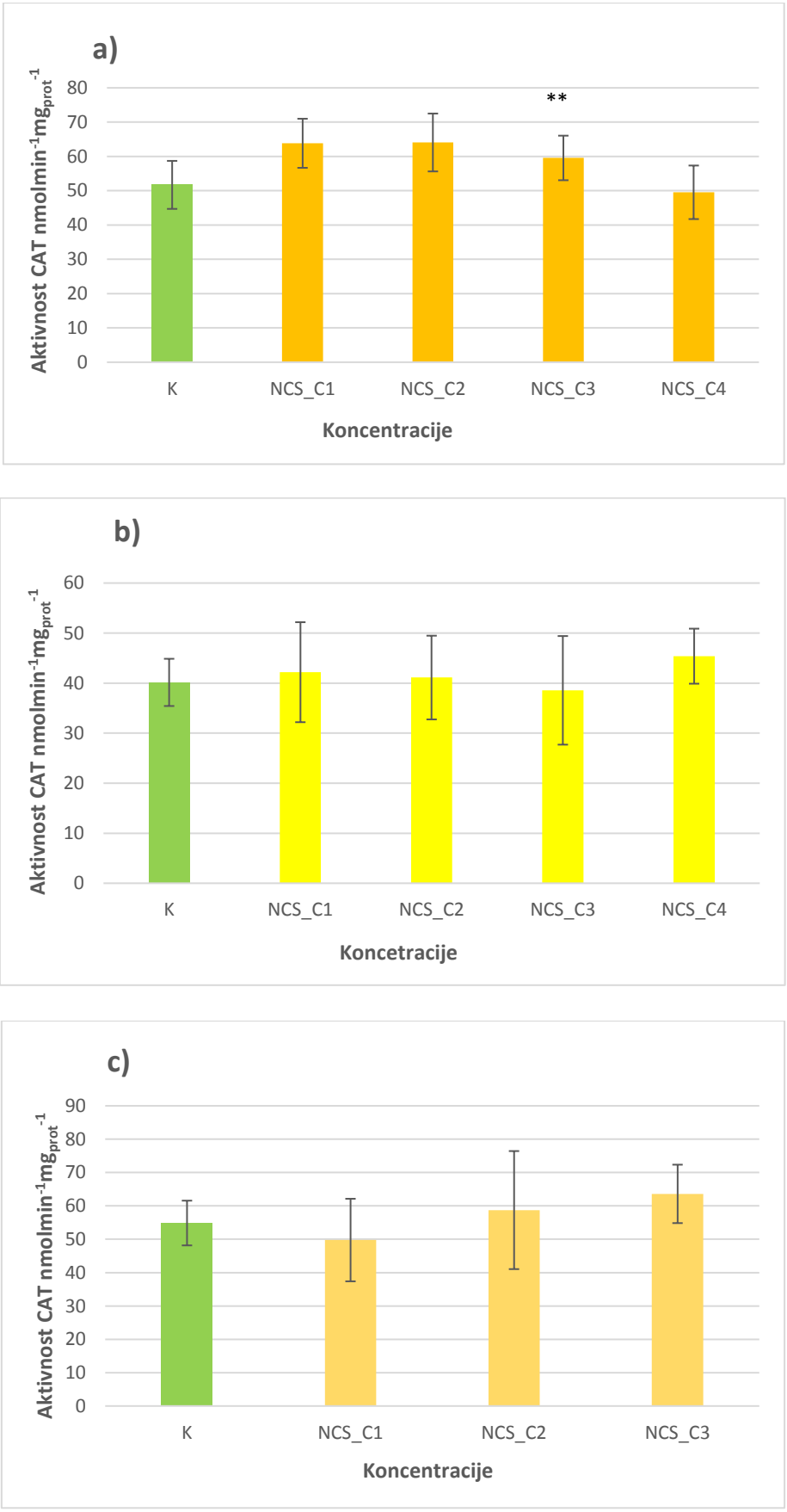
Slika 20. Aktivnost AChE nakon izlaganja nikosulfuronu (a) 48h,(b) 7 dana i (c) 28 dana

3.4.2. Aktivnost katalaze (CAT) nakon izlaganja nikosulfuronu 48h, 7 dana, 28 dana

Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze nakon izlaganja nikosulfuronu prikazani su na slici 21. Na slici 21 (a) prikazana je aktivnost CAT nakon izlaganja nikosulfuronu 48h. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika između C_1 i C_2 koncentracije u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (63,83 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_2$ (64,07 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_3$ (59,56 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_4$ (49,54 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 21 (b) prikazana je aktivnost AChE nakon izlaganja nikosulfuronu 7 dana. Nema statistički značajne razlike koncentracija u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (42,18 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_2$ (41,11 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_3$ (38,56 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_4$ (45,38 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).

Na slici 21 (c) prikazana je aktivnost katalaze nakon izlaganja nikosulfuronu 28 dana. Nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (49,75 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_2$ (58,74 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$), NCS_$C_3$ (63,59 $nmolmin^{-1}mg_{prot}^{-1}$).



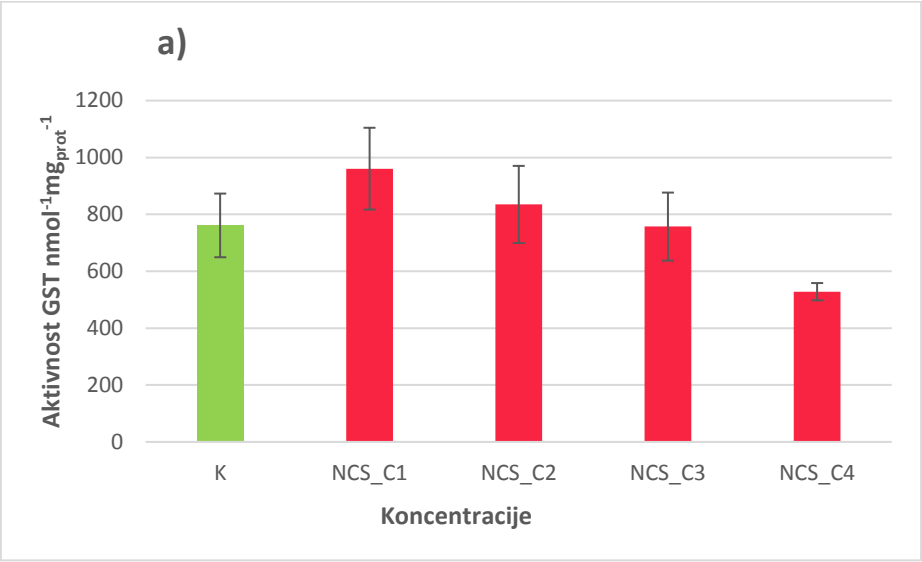
Slika 21. Aktivnost CAT nakon izlaganja nikosulfuronu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

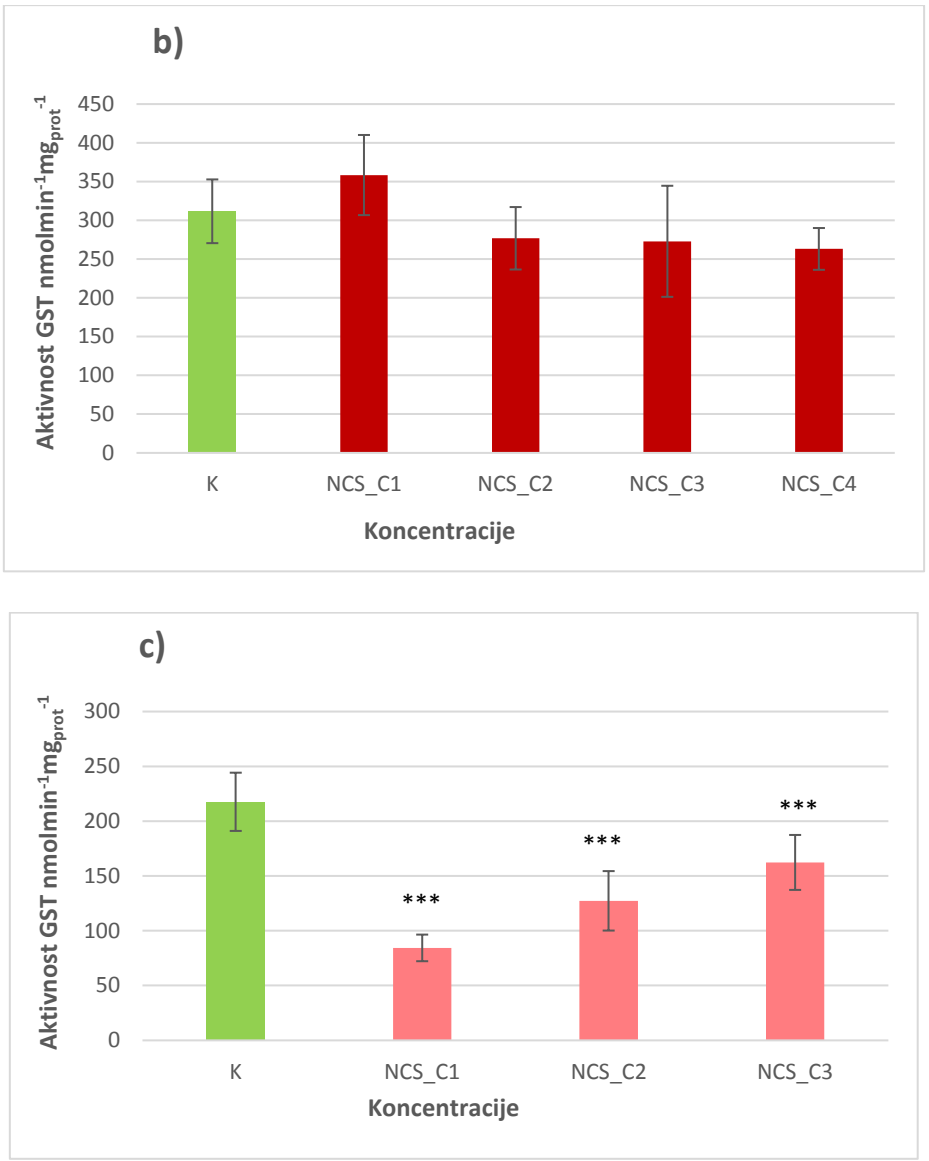
3.4.3. Aktivnost glutation-S-transferaze nakon izlaganja nikosulfuronu 48h, 7 dana, 28 dana

Rezultati mjerenja aktivnosti glutation-S-transferaze nakon izlaganja nikosulfuronu prikazani su na slici 22. Na slici 22 (a) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja nikosulfuronu 48h. Iz rezultata nije vidljiva statistički značajna razlika koncentracija u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (960,50 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_2 (834,82 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_3 (756,94 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_4 (528,11 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

Na slici 22 (b) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja nikosulfuronu 7 dana. Iz rezultata nije vidljiva statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (358,45 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_2 (276,86 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_3 (272,96 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_4 (263,14 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).

Na slici 22 (c) prikazana je aktivnost GST nakon izlaganja nikosulfuronu 28 dana. Iz rezultata je vidljiva statistički značajna razlika svih koncentracije u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Izračunata je specifična enzimska aktivnost za uzorke i utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti NCS_C_1 (84,35 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_2 (127,31 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$), NCS_C_3 (162,35 nmolmin^{-1}mg$_{prot}^{-1}$).





Slika 22. Aktivnost GST nakon izlaganja nikosulfuronu (a) 48h, (b) 7 dana i (c) 28 dana

3.5. Reproduktivni uspjeh gujavica

U tablici 7. prikazan je broj kokona nakon 28 dana. U tablici 8. prikazan je broj neizleženih kokona i juvenilnih jedinki nakon 56 dana.

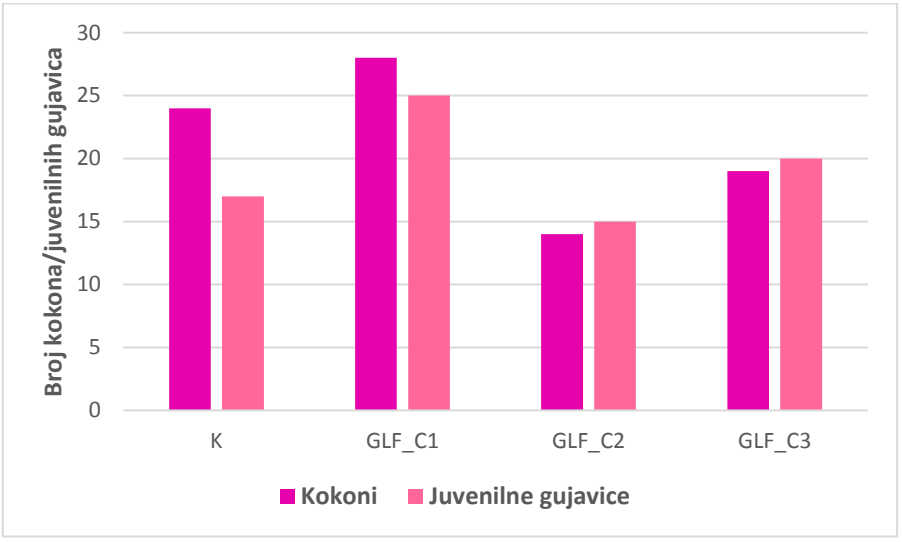
Tablica 7. Broj kokona nakon 28 dana

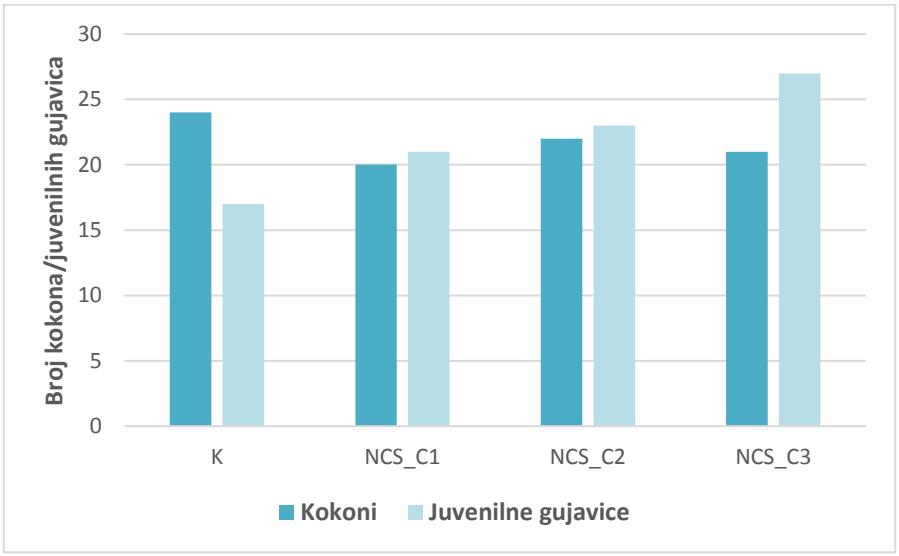
	K	GLF	NCS	TBT	DIQ
C_1	24	28	20	23	28
C_2		14	22	19	14
C_3		19	21	16	19

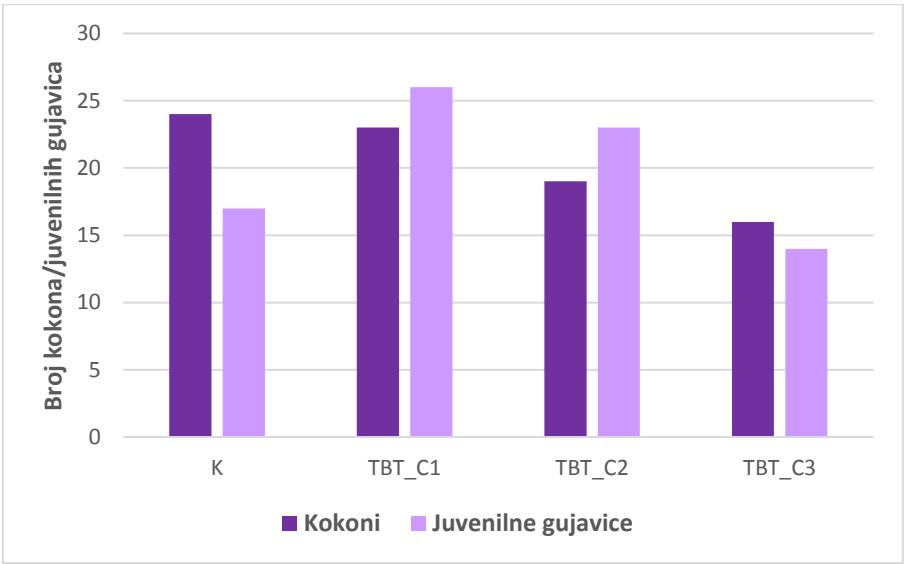
Tablica 8. Broj juvenilnih gujavica i neizleženih kokona nakon 56 dana

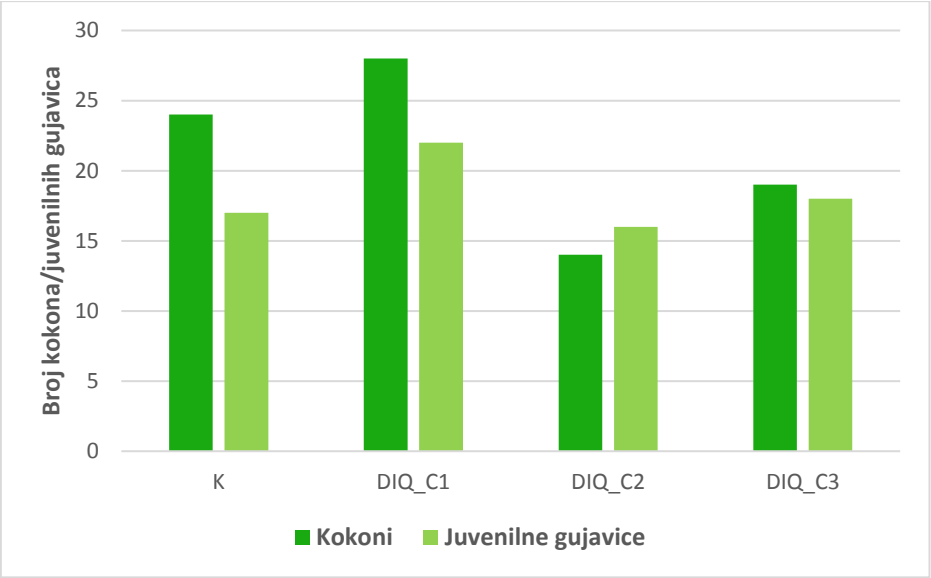
	Broj neizleženih kokona	Broj juvenilnih gujavica
K	6	17
GLF_C1	0	25
GLF_C2	3	15
GLF_C3	3	20
NCS_C1	2	21
NCS_C2	1	23
NCS_C3	3	27
TBT_C1	4	26
TBT_C2	2	23
TBT_C3	3	14
DIQ_C1	5	22
DIQ_C2	2	16
DIQ_C3	5	18

Na slici 23. prikazan je reproduktivni uspjeh gujavica nakon izlaganja herbicidima.









Slika 23. Reproduktivni uspjeh nakon izlaganja herbicidima (a) glifosat, (b) nikosulfuron, (c) tembotrion, (d) dikvat.

U tablici 9. prikazan je broj juvenilnih gujavica po odrasloj jedinki.

Tablica 9. Broj juvenilnih gujavica po odrasloj jedinki

	K	GLF	NCS	TBT	DIQ
C_1	2,83	4,17	3,5	4,33	3,67
C_2		2,5	3,83	3,83	2,67
C_3		3,33	4,5	2,33	3

4. RASPRAVA

Današnja poljoprivredna proizvodnja nezamisliva je bez uporabe pesticida. Uporaba pesticida najvažniji je čimbenik povećanja proizvodnje hrane koja je postala glavna preokupacija suvremene civilizacije. Povećane uporabe pesticida rezultira i većim onečišćenjem okoliša, stoga je važno provoditi istraživanja utjecaja pesticida na ekološke sustave. Za učinkovitu zaštitu cjelokupnog sustava, potrebno je rano otkrivanje biološkog učinka na nižim razinama što onda omogućava pravovremeno uočavanje i reparaciju viših bioloških razina poput populacija i ekoloških sustava. Laboratorijski testovi imaju važnu ulogu u procesima procjene okolišnog rizika (Spurgeon i sur., 2002). Standardiziranim testovima poput onih korištenih u ovom radu moguće je procijeniti utjecaj različitih onečišćivaća na eksperimentalne organizme.

U ovom radu kao eksperimentalni organizam korištena je gujavica vrste *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886). Gujavice posjeduju niz ekoloških i fizioloških značajki koje ih čine izvrsnim biološkim indikatorima zagađenja tla (Sanchez-Hernandez, 2006). Korištenje molekularnih biomarkera omogućava rano otkrivanje biološkog učinka na organizme te analizu toksičnosti onečišćujućih tvari, stoga je u ovom istraživanju praćen utjecaj onečišćujućih tvari, herbicida na tri biomarkera: acetilkolin esterazu (AChE), katalazu (CAT) i glutation-S-transferazu (GST) kroz tri testa toksičnosti. Mjerenjem navedenih molekularnih biomarkera dobiveni su rezultati koju ukazuju na utjecaj herbicida tembotriona, dikvata, glifosata i nikosulfurona na metabolizam i reproduktivni uspjeh istraživanih gujavica. Rezultati istraživanja pokazali su različit utjecaj pojedinih herbicida na molekularne biomarkere ovisno o trajanju izlaganja.

Acetilkolin esteraza jedan je od najistraživanijih biomarkera kod gujavica. AChE pripada skupini enzima koja je snažno inhibirana organofosfornim i karbamatnim spojevima. Mehanizam inhibicije acetilkolinesteraze sastoji se u vezanju pesticida na estersko mjesto enzima te reakcijama fosforilacije ili dekarbamilacije inaktiviraju enzim. Inhibicija aktivnosti AChE od preko 80 % nakon izlaganja organofosfatima može potencijalno dovesti do povećanja mortaliteta gujavica jer je AChE ključni enzim u prijenosu živčanog impulsa, a inhibicija ovog enzima uzrokuje nakupljanje neurotransmitera acetilkolina što u konačnici dovodi do paralize živčanog i mišićnog sustava (Velki 2014). Slabiji intenziteti inhibicije aktivnosti AChE ne dovodi nužno do mortaliteta, no može uzrokovati promjene na razini organizma poput histopatoloških, biometrijskih i anatomskih promjena. Inhibicija enzima AChE zabilježena je kod izlaganja tembotrionu nakon 48h i 7 dana, nakon izlganja od 28 dana nema značajnijih promjena u aktivnosti u odnosu na kontrolu. Wang i sur., (2015) su dobili slične rezultate nakon izlaganja gujavice *Eisenia fetida* insekticidima iz grupe neonikotinoida. Nakon 3 dana izlaganja

zabilježili su značajnu inhibiciju acetilkolin esteraze sa porastom koncentracija u odnosu na kontrolu, dok nakon 7, 14 i 21 dana zabilježen oporavak aktivnosti AChE. Kod kratkotrajnog izlaganja dikvatu i glifosatu zabilježen je porast aktivnost AChE sa porastom koncentracija, najveća aktivnost AChE zabilježena je pri najvišoj koncentraciji što se može pripisati hormetičkom učinku. Hormeza ili hormetički učinak je pojava da određena tvar u pojedinom segmentu koncentracijskog gradijenta uzrokuje suprotan učinak od očekivanog. Hormeza je kod gujavica utvrđena kod utjecaja temefosa na AChE (Hackenberger i sur., 2007), kod utjecaja deltametrina i pirimifos-metila na AChE (Velki i Hackenberger 2013), kod utjecaja kadmija na aktivnost katalaze i superoksid dismutaze (Zhang i sur., 2009). Pojava hormeze pokazuje da je uslijed izloženosti niskim koncentracijama herbicida došlo do kompenzacijskog odgovora organizma (Calabrese i Baldwin, 2003). Aktivnost AChE nakon 7 i 28 dana je inhibirana, inhibicije acetilkolinesteraze se sastoji u vezanju herbicida na estersko mjesto enzima te reakcije fosforilacije ili dekarbamilacije inaktiviraju enzim. Kod izlaganja glifosatu u trajanju od 7 i 28 dana nema zabilježenih značajnih promjena u aktivnosti što se može pripisati oporavku aktivnosti enzima. Izlaganja nikosulfuronu nije pokazalo značajnije promjene u aktivnosti u odnosu na kontrolu, inhibicija enzima je zabilježena samo kod izlaganja u trajanju 28 dana. Sanchez–Hernandez i sur., (2014) izlagali gujavicu *Aporrectodea caliginosa* pirimifos-metilu u trajanju od 3 i 21 dan, inhibicija je također bila značajnije izražena nakon 21 dan izlaganja. Inhibicija aktivnosti AChE zabilježena je i na drugim organizmima nakon izlaganja herbicidima korištenim u ovom radu. Inhibiciju aktivnosti AChE od 27 % zabilježili su Glusczak i sur., (2007) u mozgu ribe *Rhamdia quelen* nakon izlaganja glifosfatu. Boyli i sur., (2013) zabilježili inhibiciju aktivnosti AChE nakon izlaganja pčele medarice (*Apis mellifera* L.) glifosatu. Utjecaj glifosata praćen i na vodozemcima, nakon izlaganja žabe *Rhinella arenarum* različitim komercijalnim pripravcima na bazi glifosata zapažena značajna inhibicija aktivnosti acetilkolin esteraze, čak 71,62 % u odnosu na kontrolu (Lajmanovich i sur., 2011). Istraživanja aktivnosti AChE u mozgu ribe *Carassius auratus* nakon izlaganja nikosulfuronu pokazala inhibiciju aktivnosti (Bretaud i sur., 2000).

Osim primarnog mehanizma djelovanja, toksičnosti herbicida može doprinijeti i poremećaju u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u stanicama. Poznato je da različite skupine pesticida induciraju oksidativni stres (Banerjee i sur., 2001). Aktivnost katalaze i glutation-S-transferaze imaju veliku važnost u detoksikaciji različitih zagađivala.

Katalaza (CAT) je enzim prisutan u peroksisomima gotovo svih aerobnih stanica i služi za zaštitu stanica od toksičnih učinaka vodik peroksida. Kao enzim koji katalizira peroksid

katalaza je mjerljivi pokazatelj oksidativnog stresa te ju možemo nazvati biomarkerom oksidativnog stresa. Porast aktivnosti katalaze nakon 48h i 28 dana izlaganja tembotrionu može se okarakterizirati kao metabolička prilagodba neprekidnoj izloženosti pesticida i odgovor na obranu protiv oksidativnih oštećenja. Nakon izlaganja dikvatu 48h vidljiv je značajan porast aktivnosti katalaze s povećanjem koncentracije. Međutim izlaganja dikvatu 7 dana rezultiralo je smanjenom aktivnosti katalaze u odnosu na kontrolu. Snižene vrijednosti katalaze mogu se pripisati velikoj proizvodnji superoksid anion radikala za kojeg se zna da inhibira CAT aktivnost u slučaju prekomjerne proizvodnje (Bagnyukova i sur., 2005). Stoga smanjena aktivnost je rezultat preopterećenja prirodne antioksidativne obrane organizma pri najvećim koncentracijama izlaganja. Dikvat pretvara molekularni kisik u superoksidni anion te redoks reakcijama nastaje vodikov peroksid (Osburn i sur., 2006). Dikvat se ne veže kovalentno s biološkim molekulama, ali potiče staničnu produkciju ROS-a. Iz tih razloga se dikvat često koristi kao djelotvorno kemijsko sredstvo za indukciju oksidativnog stresa (Slaughter i sur., 2002; Osburn i sur., 2006). ROS se može neutralizirati s nekoliko antioksidansa u biološkom sustav. SOD, CAT i GPx glavni su antioksidativni enzimi biološkog sustava (Wozniak i sur., 2004; Slavic i sur., 2006; Lestaevel i sur., 2009). CAT može pretvoriti vodikov peroksid u molekularni kisik i vodu. CAT može biti aktivirana i niskom koncentracijom H_2O_2 (Makino et al., 1994). Stoga, CAT igra važnu ulogu u odupiranju oksidativnom stresu (Mates i Sanchez-Jimenez, 1999). Istraživanje provedeno na svinjama pokazalo smanjenu aktivnost CAT nakon primjene dikvata (Lv i sur.,2012). Također Gallagher i sur., (1995) zabilježili smanjenu ekspresiju CAT u jetri štakora nakon primjene dikvata. Prilikom izlaganja glifosatu zabilježen je značajan porast aktivnosti katalaze samo nakon kratkotrajnog izlaganja herbicidima, dugotrajna izlaganja nisu pokazala statistički značajnu razliku u aktivnosti katalaze u odnosu na kontrolu. Slične rezultate dobili Song i sur., (2009.) nakon izlaganja gujavice *Eisenia fetida* atrazinu nakon kraćeg izlaganja značajan porast aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu, dok nakon 14, 21 i 28 dana nema značajnijih promjenu u aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu. Izlaganje nikosulfuronu nije pokazalo značajan utjecaj na aktivnost katalaze, statistički značajan porast aktivnosti u odnosu na kontrolu zabilježen je nakon 28 dana izlaganja pri najvišoj koncentraciji. Sličan rezultat zabilježili su Ribera i sur., (2001) pri proučavanju učinaka karbarila na CAT, pri različitim koncentracijama i vremenima ekspozicije kod gujavica. Ribera i sur., (2001) nisu zabilježili nikakve značajne promjene u aktivnosti katalaze kada su gujavice bile izložene umjetnom tlu kontaminirane karbarilom (12, 25 i 50 mg / kg). S obzirom na to da nikosulfuron pripada skupini inhibitora acetolaktat sintaze u biljkama, a ljudi i životinje nemaju taj enzim to može biti jedan od razloga niske toksičnosti ovog herbicida na ljude i životinje.

CAT je jedan od glavnih enzima za uklanjanje slobodnih radikala, pa regulacija ovog enzima ponajviše ovisi o oksidativnom statusu stanice. Stoga praćenje aktivnosti ovog enzima kao biljega oksidativnog stresa može biti vrijedan instrument u praćenju utjecaja zagađenja.

Glutation S-transferaza (GST) je citosolni enzim koji ima veliku važnost zbog svoje uloge u kataliziranju konjugacije različitih endogenih i egzogenih elektrofilnih supstrata s tripeptidom glutationom (GSH). GST je enzim faze II metabolizma, enzimi faze II imaju vrlo važnu ulogu u održavanju homeostaze kao i u detoksikaciji i ekskreciji mnogih ksenobiotika. Smanjenje aktivnost GST za značaj može imati umanjenu sposobnost izlučivanja metabolita, tj. produkata nakon I faze metabolizma (Stepić, 2010). Smanjena aktivnost GST zabilježena je kod sedmodnevnog izlaganja tembotrionu. Aktivnost GST nakon kratkotrajnog izlaganja dikvatu značajno je porasla. Porast aktivnosti GST nakon izlaganja dikvatu zabilježen kod puža barnjaka *Lymnaea stagnalis*. Puž barnjak kao herbivorna vrsta često izložena herbicidima kao neciljani organizam (Bouétard 2013). Nakon dugotrajnijeg izlaganja dikvatu vidljiva statistički značajna inhibicija aktivnosti GST s porastom koncentracija. Schreck i sur., (2008) izlagali su gujavicu *Aporrectodea caliginosa nocturna* smjesi šest različitih pesticida nakon 3 dana izlaganja zabilježili su značajan porast aktivnosti GST, nakon 7 dana nije bilo značajne razlike u aktivnost u odnosu na kontrolu dok je nakon 14 dana aktivnost GST bila značajno inhibirana.

Smanjena aktivnost GST zabilježena je nakon 48h izlaganja glifosatu. Inhibicija aktivnosti GST bi mogla proizaći iz promjena enzimske sinteze, kao i inaktivacije GSH i glutation enzima, što dovodi do gubitka sposobnosti GST-a da uklone herbicid. Dugotrajno izlaganje glifosatu rezultiralo je porastom aktivnosti GST. Povećanu aktivnosti GST zabilježili Modesto i Maritnez (2010) u jetri ribe *Prochilodus lineatus* nakon 24h i 98 dana izlaganja glifosatu. Povećanje aktivnosti GST tijekom perioda oporavka ukazuje na to da GST oporavlja detoksikaciju i antioksidacijske kapacitete i igra važnu ulogu u uklanjanju herbicida ili njegovih metabolita. Zhang i sur., (2017) izlagali gujavicu *Eisenia fetida* insekticidu iz grupe neonikotinoida aktivnost GST je značajno inhibirana nakon 7 i 14 dana, dok je porast aktivnosti zabilježen nakon dužeg izlaganja 35, 42 i 56 dana izlaganja. Izlaganje nikosulfuronu pokazuje opadanje aktivnosti GST sa porastom koncentracije. Smanjenu aktivnost GST zabilježili su Tejada i sur., (2016) nakon izlaganja gujavica *Eisenia fetida, Lumbricus terrestris* i *Allolobophora molleri* herbicidu oksifluorfenu.

Ovisno o herbicidu kojem su gujavice bile izložene, o primijenjenom testu toksičnosti, kao i o vremenu izlaganja, postojale su razlike u promjeni aktivnosti ovih enzima, odnosno zabilježeno

je i povećanje i smanjenje aktivnosti. Zbog brojnih čimbenika koji utječu na aktivnost antioksidativnih enzima vrlo često je teško predvidjeti odgovor antioksidansa na izloženost zagađivalu (Regoli i sur., 2003; Van der Oost i sur., 2003). Iako nije detektirana jednoznačna promjena u mjerenim biljezima, izmjerene promjene u odgovoru biljega pokazuju da je oksidativni stres najvjerojatnije važan čimbenik toksičnosti istraživanih herbicida.

Gubitak mase i smanjena reproduktivna sposobnost su osjetljivi parametri u praćenju učinaka pesticida i stoga se koriste u praćenju stanja okoliša i procjeni rizika (Edwards i Bater, 1992). Izlaganje herbicidima pokazalo je negativan utjecaj na reproduktivni uspjeh gujavice vrste *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886). Kod svih herbicida (dikvat, tembotrion, glifosat) osim nikosulfurona zabilježen je smanjen reproduktivni uspjeh gujavice, smanjen je broj kokona i juvenilnih gujavica sa porastom koncentracije. Međutim na najmanjoj koncentraciji C_1 zabilježen je povećan broj juvenilnih gujavica u odnosu na kontrolu što se može pripisati hormezi. Hormetički učinak ili hormeza je definirana kao pojava da određena tvar, u pojedinom segmentu koncentracijskog gradijenta uzrokuje suprotan učinak od očekivanog (Calabrese i Baldwin 2003). Pad broja kokona zabilježili su Tejada i sur., (2016) nakon izlaganja gujavica *Eisenia fetida, Lumbricus terrestris* i *Allolobophora molleri* herbicidu oksifluorfenu. Yasmin i D'Souza (2007) nakon izlaganja gujavice *Eisenia fetida* pesticidima karbendazimu, dimetoatu i glifosatu isto zabilježili smanjen broj kokona i juvenilnih gujavica. Osim na smanjen reproduktivni uspjeh kod gotovo svih koncentracija zabilježen je i mortalitet juvenilnih jedinki.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Herbicidi imaju značajan utjecaj na metabolizam i reproduktivnu sposobnost istraživane vrste gujavice *Dendrobaena veneta* (Rosa 1886).
- Izlaganje istraživanim herbicidima uzrokovalo je promjene u aktivnosti enzima AChE, CAT, GST.
- Promjena u odgovoru molekularnih markera ovisila je o vrsti herbicida kojem su gujavice bile izložene i o vrsti primijenjenog testa toksičnosti.
- Razina ekspresije biomarkera ovisi o vremenu izlaganja te koncentracijama.
- Iz prirode promjena mjerenih biomarkera može se zaključiti da je oksidativni stres važan čimbenik toksičnosti istraživanih pesticida na gujavice.
- Okolišno relevantne koncentracije uzrokovale mjerljiv toksikološki učinak na organizmima.

6. LITERATURA

Antunes SC, Castro BB, Nunes B, Pereira R, Gonçalves. 2008. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotox. Environ. Safety.* 71, 620-631.

Arnold R, Hodson M. 2007. Effect of time and mode of depuration on tissue copper concentrations of the earthworms *Eisenia andrei, Lumbricus rubellus* and *Lumbricus terrestris. Environ. Pollut*. 148,21-30.

Bagnyukova TV, Vasylkiv OY, Storey KB, Lushchak VI. 2005. Catalase inhibition byamino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Res*. 1052, 180-186.

Baličević R, Ravlić M. 2014, *Herbicidi u zaštiti bilja*, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 4 str

Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health* 16, 1–40.

Binet F, Fayolle L, Pussard M. 1998. Significance of earthworms in stimu-lating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 27, 79-84

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.

Bompart GJ, Prevot DS, Bascands JL. 2000. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: Application to cisplatin-induced toxicity. *Clin. Biochem*., 23: 501-504

Booth LH, Heppelthwaite V, Eason CT. 1998. Cholinesterase and glutathione Stransferase in the earthworm *Apporectodea caliginosa* as biomarkers of organophosphate exposure. Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf. 138-142

Bouché MB. 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systématique. *Ann. Soc. Ecol. Anim*. 72

Bouétard A, Besnard AL, Vassaux D, Lagadic L, Coutellec MA. 2013. Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology*, 126, 256-265.

Bretaud S, Toutant JP, Saglio P. 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 117-124.

Brown PJ, Long SM, Spurgeon DJ, Svendsen C, Hankard PK. 2004. Toxicological and Biochemical Responses of the Earthworm *Lumbricus rubellus* to Pyrene, a Non-Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. *Chemosphere, 57,* 1675-1681.

Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A. 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Sci. Rep*. 3

Calabrese EJ, Baldwin LA. 2003. The hormetic dose-response model is more common that the threshold model in toxicology. Toxicological Sciences 71: 246–250.

Claiborne A. 1985. Catalase activity. In : R. A. Greenwald (ed.), CRC Handbook of methods of oxygen radical research, pp. 283-284

Clark A, Shamaan N, Sinclair M, Deuterman W. 1986. Insecticide metabolism by multitple glutathione S-transferase in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L). *Pesticide Biochemistry Physiology* 25: 169-175.

Contardo-Jara V, Wiegand C. 2008. Biotransformation and atioxidant enzymes of *Lumbriculus variegates* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere.* 70, 1879-1888.

Depledge MH, Fossi MC. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology 3,* 161-172.

Dominguez-Cortinas G, Saavedra JM, Santos-Medrano GE, Rico-Martínez R. 2008. Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*. *Toxicological and Environ Chemistry*, 90(2), 377-384.

Dumas E, Giraudo M, Goujon E, Halma M, Knhili E, Stauffert M, Batisson I, Besse-Hoggan P, Bohatier J, Bouchard P, CelleJeanton H, Costa Gomes M, Delbac F, Forano C, Goupil P, Guix N, Husson P, Ledoigt G, Mallet C, Mousty C, Prevot V, Richard C, Sarraute S. 2016. Fate and ´ ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: An overview to assess the environmental risks, *Journal of Hazardous Materials*

Edwards CA, Bater JE. 1992. The use of earthworms in environmental management. *Soil Biol. Biochem*. 24 (12), 1683–1689.

Ellman GL, Courtney KD, Andreas jr V, Featherstone RM, 1961. A new and rapidcolorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95

Gallagher EP, Buetler TM, Stapleton PL, Wang C, Stahl DL, Eaton DL 1995.The effects of diquat and ciprofibrate on mRNA expression and catalytic activities of hepatic xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134, 81–91 5.

Gambi, N, Pasteris A, Fabbri E. 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comp. Biochem. Physiol*. 145C, 678-685

Gastaldi L, Ranzato E, Capri F, Hankard P, Péres G, Canesi L, Viarengo A, Pons G. 2007. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146.3: 398-405.

Gaupp-Berghausen M, Hofer M, Rewald B, Zalle JG. 2015. Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations.*Scientific Reports. 5.* 1-9

Glusczak L, dos Santos Miron D, Moraes B S, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, Loro VL. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 519-524.

Habig WH, Pabst MJ, Jakobi W, 1974. Glutathione S-Transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry* 249, 22

Hackenberger BK, Jarić-Perkušić D, Stepić S. 2008. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotox. Environ. Safety*. 71, 583-589.

Hornsby AG, Wauchope RD, Herner AE. 1996. *Pesticide properties in the enviroment*, (Vol. 1). Springer Science & Business Media. 286 pp

Kortekamp A. 2011. Unexpected side effects of herbicides: Modulation of plant-pathogen interactions." *Herbicides and Environment. InTech* 85 – 97

Lajmanovich RC, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM, Cabagna MC. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-

esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 681-689.

Lee KE. 1985. Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use, CSIRO, Sydney, 411 pp

Lestaevel P, Romero E, Dhieux B, Ben Soussan H, Berradi H, Dublineau I, Voisin P, Gourmelon P. 2009. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258, 1–9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lukkari T. 2004. Earthworm Responses to Metal Contamination, Tools for soil quality assessment, University of Jyväskylä, 64 pp

Lv M, Yu B, Mao XB, Zheng P, He J, Chen DW. 2012. Responses of growth performance and tryptophan metabolism to oxidative stress induced by diquat in weaned pigs. animal, 6(6), 928-934.

Lydy MJ, Linck SL. 2004. Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida.* Arch. *Environ. Contam. Toxicol. 17*, 27-44.

Mahmood I, Imadi S, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. 2016. Effects of Pesticides on Environment *Plant, Soil and Microbes* 254-266

Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y 1994. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 269, 1020–1025

Marino F, Ligero A, Cosin DJD. 1992. Heavy metals and earthworms on the border of a road next to Santiago. *Soil Biology and Biochemistry, Vol. 24*, 1705–1709

Mates JM, Sanchez-Jimenez F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 4, D339–D34

Mekahlia MN, Tine S, Menasria T. Amieur H, Salih H. 2016. In Vitro Biomarker Responses of Earthworm *Lumbricus terrestris* Exposed to Herbicide Sekator and Phosphate Fertilizer. *Water Air Soil Pollut*

Modesto KA, Martinez CB. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus. Chemosphere*, 78(3), 294-299.

Morgan AJ, Stürzenbaun SR, Winters C, Grime GW, Aziz NAA, Kille P. 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 57*, 11-19

Muthukaruppan G, Janardhanan S, Vijayalakshmi GS. 2005. Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes. *Journal of Soils Sediments* 5, 82-86

OECD, 1984. Guideline for testing of chemicals. In: Earthworm Acute Toxicity Tests, No. 207. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris

OECD, 2004. Guideline for testing of chemicals. Earthworm Reproduction test *(Eisenia fetida/Eiseina andrei*). No. 222

Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, Kensler TW. 2006. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 454, 7–15

Otitoju O, Onwurah INE. 2011. Biomarkers of Pesticide - Contaminated Environment, Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, *In Tech.* 241 – 152

Palmeira, CM. 1999. Herbicide-induced mitochondrial and cellular toxicity: A review of paraquat, dinoseb and 2,4-D effects. *Toxic Substances Mechanisms*, 18: 187 – 204.

Pelosi, C. 2013. Reduction of pesticide use can increase earthworm populations in wheat crops in a European temperate region. Agric Ecosyst Environ 181, 223–230

Pierzynski GM, Sims JT, Vance GF. 2000. Organic Chemicals in the Environment, In: Soils and environmental quality, CRC Press (2nd Ed.), Lewis Publishers, USA 356 pp

Piotrowicz-Ciesalk AJ, Adomas B. 2012. Herbicide Phytotoxicity and Resistance in Legume Plants, Herbicides - Environmental Impact Studies and Management Approaches, R Alvarez-Fernandez, 9 - 44

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

Regoli F, Winston GW, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S (2003) Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2120–2129.

Ribera D, Narbonne JF, Arnaud C, Saint-Denis M. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol. Biochem*. 33, 1123-1130

Rodriguez-Castellanos L, Sanchez-Hernandez C., 2007. Eartworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *J. Pest. Sci*. 32, 4, 360-371.

Sanchez-Hernandez JC, Narvaez C, Sabat P, Martínez Mocillo S. 2014. Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Sci. Total Environ*., 490, 445-455

Sanchez-Hernandez, JC. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev Environ Contam Toxicol*. 188, 85-126

Schreck E, Geret F, Gontier L, Trilhou M, 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere.* 71, 1832-1839.

Singh B, Singh K. 2016. Microbial degradation of herbicides, Critical reviews in microbiology, 42(2), 245-261

Slaughter MR, Thakkar H O', Brien PJ. 2002. Effect of diquat on the antioxidant system and cell growth in human neuroblastoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 178, 63–70

Slavic M, Appiah I, Nikolic-Kokic A, Radojicic R, Jones DR, Spasic MB, Milovanovic S, Blagojevic D. 2006. The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity. Acta Physiologica Hungarica 93, 335–339.

Song Y, Zhu LS, Wang J, Wang JH, Liu W, Xie H. 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia fetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5), 905-909.

Spurgeon JD, Weeks JM, Van Gestel CAM, 2002. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia.* 47, 588-606

Stenersen J., 1984. Detoxification of xenobiotics in earthworms. *Comp. Biochem Physiol*. 78C, 249-252.

Stepić S. 2010. Promjene toksičnih učinaka smjesa pesticida na molekularne markere izloženosti kompostne gujavice (*Eisenia andrei).* Doktorski rad, Odjel za biologiju, Osijek

Subler S, Baranski CM, Edwards CA. 1997. Earthworm additions increased short-term nitrogen availability and leaching in two grain crop agroecosys-tems. *Soil Biology and Soil Biochemistry* 29, 413-421

Suter GW. 1990. Use of biomarkers in ecological risk assessment. *Biomarkers of Environmental Contamination., Lewis Publishers*, Chelsea, Michigan. 419-428.

Tarara G, Fliege R, Desmarteau D, Kley C, Peters B. 2009. Environmental fate of tembotrione, Bayer Crop J. 63-73

Tejada M, Gómez I, Franco-Andreu L, Benitez C. 2016. Role of different earthworms in a soil polluted with oxyfluorfen herbicide. Short-time response on soil biochemical properties. *Ecological Engineering*, 86, 39-44.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13.2, 57-149.

Velki M. 2014. Usporedba triju sustava testiranja toksičnosti pesticida dimetoata, pirimifos-metila i deltametrina upotrebom molekularnih biljega gujavica (*lumbricidae*). Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, 92-95

Velki M, Hackenberger BK, 2013. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. Chemosphere 90, 1216–1226

Vereecken, H. 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. Pest management science, 61(12), 1139-1151

Vijver MG, Vink JPM, Miermans CJH, Van Gestel CAM. 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. Soil *Biology and Biochemistry, Vol. 35,*. 125-132

Wang J, Zhu L, Liu W, Wang JK, Xie H. 2012. Biochemical responses of earthworm (*Eisenia fetida*) to the pesticides chlorpyrifos and fenvalerate. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 236–241

Wang K, Mu X, Qi S, Chai T, Pang S, Yang Y, Wang C, Jiang J. 2015. Toxicity of a neonicotinoid insecticide, guadipyr, in earthworm (*Eisenia fetida*). *Ecotox. Environ. Safety.*, 114, 17-22

Ware GW, Whitacre DM. 2004. *The Pesticide Book*. 6th ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio. 496 pp

Wason, S. 2003. Developmental Toxicity Study in the Rat by Gavage. Unpublished study prepared by Bayer Cropscience. 203

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva

Woodburn, AT. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest. Manag. Sci*. 56, 309–312

Wozniak A, Drewa G, Wozniak B, Schachtschabel DO. 2004. Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. Zeitschrift fu¨r Gerontologie und Geriatrie 37, 184–189.

Yasmin S, D'Souza D. 2010. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. Applied and Environmental Soil Science 529-532

Zaller JG, Heigl F, Ruess L, Grabmaier A. 2014. Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. Sci. Rep. 4,

Zarea MJ, Karimi N. 2012. Effect of Herbicides on Earthworms, *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 5-13

Zhang Y, Shen G, Yu Y, Zhu H. 2009. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in earthworm *Eisenia fetida. Environ. Poll*. 157, 3064-3068.

Zhang Y, Zhang L, Feng L, Mao L, Jiang H. 2017. Oxidative stress of imidaclothiz on earthworm *Eisenia fetida.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 191, 1-6.