Učinak pesticida klorpirifosa na dagnju Mytilus galloprovincialis

Medić, Nikola

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:744329

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJI ZNANOST O MORU

NIKOLA MEDIĆ

UČINAK PESTICIDA KLOROPIRIFOSA NA DAGNJU *Mytilus galloprovincialis* (*Lam.*): AKTIVNOST KISELE DNAZE I TOKSIČNOST TKIVA

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2015.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJI ZNANOST O MORU

NIKOLA MEDIĆ

UČINAK PESTICIDA KLOROPIRIFOSA NA DAGNJU *Mytilus galloprovincialis* (*Lam.*): AKTIVNOST KISELE DNAZE I TOKSIČNOST TKIVA

ZAVRŠNI RAD

JMBAG

Status: redovan student

Kolegij: Fiziologija morskih organizama

Mentor: izv. Prof. Dr. sc. Maja Fafanđel

Komentor: dr. sc. Ines Kovačić

Pula, 2015.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani Nikola Medić, kandidat za prvostupnika Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student: Nikola Medić

U Puli, 14. 09. 2015. _____

Ovaj završni rad izrađen je u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju na Centru za Istraživanje Mora Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom dr.sc. Maje Fafanđel i komentorice dr.sc. Ines Kovačić. Rad je predan na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanosti o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnika (baccalaurea) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao izv. prof. dr. sc. Maju Fafanđel i za komentora dr. sc. Ines Kovačić.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel
Komentor: dr. sc. Ines Kovačić

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:
Predsjednik: prof. dr. sc. Renato Batel
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj
Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj
Komentor: dr. sc. Ines Kovačić
Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Član: izv. prof. dr. sc. Tamara Đakovac
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 14. rujna 2015., u 13:00, Centar za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Nikola Medić

_____

ZAHVALE

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Fafanđel na povjerenju, savjetima i svoj pomoći u izradi ovog završnog rada.

Od srca velike zahvale dr. sc. Ines Kovačić na velikom strpljenju za vrijeme laboratorijskog rada, pomoći u pisanju i izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Loreni Perić na izrađenom pokusu izlaganja dagnji koncentracijama pesticida u laboratoriju za Morsku molekularnu toksikologiju i ekotoksikologiju na Centru za istraživanje mora Ruđer Bošković.

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

Velike zahvale svojoj obitelji, prijateljima i najviše kolegama Vanji, Victoru, Roberti, Žani i Matei na podršci, savjetima i strpljenju.

SADRŽAJ

1. UVOD 7
1.1. Pesticidi i njihov učinak na vodene organizme 7
1.2. Organofosforni pesticidi 8
1.3. Klorpirifos 8
2. Određivanje učinka toksičnih pojeva 10
2.1. Bakterijski testovi toksičnosti 10
2.2. Bioindikatorski organizmi – dagnja *Mytilus galloprovincialis* 10
2.3. Kisele Dnaze 11
3. MATERIJALI I METODE 13
3.1. Kemikalije 13
3.2. Izlaganje dagnje pesticidu klorpirifosu 13
3.3. Homogenizacija tkiva 14
3.4. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-u 14
3.5. Određivanje aktivnosti kiselih DNaza 14
3.6. Određivanje toksičnosti tkiva Microtox® – testom 15
3.7. Statistička obrada rezultata 15
4. REZULTATI 16
4.1. Aktivnosti kisele DNaze 16
4.2. Toksičnost tkiva 20
5. RASPRAVA 21
6. ZAKLJUČCI 23
7. LITERATURA 24

UVOD

Procjena rizika i mogućih toksičnih učinaka mješavina pesticida na neselektivne organizme u vodenome okolišu veliki je izazov za znanstvenu zajednicu (Spurgeon i sur., 2010). Istraživanja moraju uključiti odgovore izloženih organizama na svi razinama biološke organizacije od razine staničnih makromolekula (enzima, DNA), tkiva, organe te na koncu jedinke i populacije.

1.1. Pesticidi i njihov učinak na vodene organizme

Veliku skupinu otrovnih kemijskih spojeva čine pesticidi, komercijalni proizvodi za suzbijanje štetnih mikroorganizama, gljivica, kukaca, grinja, puževa, glodavaca, ptica, korova, algi, lišaja i drugih organizama. Pesticidi su sintetske, rjeđe prirodne, selektivno toksične tvari, namijenjene suzbijanju (ubijanju) štetnih mikroorganizama, gljivičnih, biljnih i životinjskih štetnika i nametnika (O. P. Springer., 2001). Proizvodnja pesticida značajna je gospodarska grana. U svijetu se iz temeljnih 750 spojeva s pesticidnim karakteristikama proizvodi više od 10. 000 različitih preparata. Procjenjuje se da se godišnje u svijetu proizvede ukupno od 50 do 60 milijuna tona različitih pesticida. U Europskoj uniji uvedeni su novi restriktivniji propisi za puštanje u promet pesticida, i to zbog brojnih spoznaja o njihovim sporednim štetnim učincima za ostale organizme u prirodi i zdravlje ljudi. Stoga je obavezna reevaluacija, odnosno ponovna procjena prikladnosti pojedinih preparata. Za taj je postupak potrebna opsežna dokumentacija ne samo o pesticidnoj djelotvornosti, nego i o sporednim toksičnim djelovanjima, posebno na ekosustav. Tijekom postupka se zbog strožih ekoloških i toksikoloških kriterija neke tvari zabranjuju za uporabu (O.P. Springer i D. Springer., 2008). Više od 98% insekticida i 95% herbicida osim na ciljano područje dostiže šire područje od ciljanog te je utvrđeno da ne djeluju selektivno samo na štetnike i nametnike (G.T. Miller., 2008). Zbog te karakteristike definirani su kao biocidi. Pesticidi koji se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji ne ostaju trajno u prirodi u obliku u kojem su upotrijebljeni. Detoksikacija pesticida može se odvijati djelovanjem svjetlosti, vode, mikroorganizmi i topline. Međutim mnogi se pesticidi sami ili u kombinaciji s drugim kemikalijama u tlu, vodi ili organizmima transformiraju u još štetnije spojeve. Nastupa njihova toksikacija. Znatan broj pesticida je teško razgradiv (O.P. Springer i D. Springer., 2008).

U vodenim ekosustavima pesticidi imaju štetan učinak na biotu, ponekada rezultira i smrtonosnim ishodom za ribe i ostale organizme (Toughill., 1999). U hranidbenom lancu koncentracija otrova raste bez obzira na to dal neka skupina organizma dolazi direktan dodir s otrovom (O.P. Springer i D. Springer., 2008). U morskom ekosustavu karnivorne ribe imaju najveću koncentraciju pesticida u tkivima.

Budući da biomagnifikacijom koncentracija štetnih tvari raste proporcionalno s razinama hranidbenog lanca,najveće koncentracije pesticida imati će morske ptica koje se hrane ribom i ljudi (Castro, P. i M. E.Huber., 2010).

1.2. Organofosforni pesticidi

U posljednjim godinama najšire su korišteni organofosforni pesticidi zbog njihove biorazgradivosti u odnosu na organoklorne pesticide s toga važno je razumjeti pojavu tih pesticida u vodenim ekosustavima i njihov mogući učinak na vodene organizme (M. N. Canty, J. A. Hagger, R. T.B. Moore , L. Cooper,i T. S. Galloway., 2007). Opće je poznato da je organofosfornim pesticidima zajednički mehanizam inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) koji je odgovoran za hidrolizu neurotransmitera acetilkolina na kolinergičkoj sinapsi. Osim acetilkolinesteraze organofosforni pesticidi inhibiraju aktivnost ostalih enzima: B – esteraza kao butirilkolinesteraza i karboksilesteraze (Sogorb i Vilanova., 2002). Procjena inhibicije acetilkolinesteraze u prirodnim populacijama utvrđen je biomarker zagađenja organofosfornih pesticida unatoč njihovom poluživotu u okolišu i brzom metabolizmu u organizmima (Gagnaire i sur. ., 2008, Lacorte i sur., 1995, WHO, 1986). Oporavak jedinki izloženim organofosfornim pesticidima vrlo je spor, prisutna je inhibicija enzima iako organofosfata više nema u okolišu (Escartin ai Porte., 1996, Ferrari i sur., 2004, Kristoff i sur., 2006, 2011, 2012, Kumar i sur., 2010, Rodriguez., 2009).

1.3. Klorpirifos

Klorpirifos je organofosforni insekticid široko korišten na usjevima hrane za kontrolu insekata (Palma i sur., 2009). Prisutan je u morskom okolišu i organizmima Američke obale od 1990 (USEPA 2002).Vrijednosti klorpirifosa površinskih voda procijenjena je od strane Agencije za zaštitu okoliša u rangu između 0.026 i 0,4 μg/L (EPA,UESPA, 2006).

Klorpirifos nalazi se na listi prioriteta Europske Direktive o vodama za zaštitu vodenih ekosustava (Direktiva 1008/105/ec) (Franzellitti i sur., 2011).

Za razliku od ostalih organofosfornih pesticida klorpirifos je perzistentniji, njegov poluživot u vodi iznosi 29 – 74 dana (Racke, 1993., EPA USEPA, 2006; Palma i sur., 2009). Kao i ostali organofosforni pesticidi inhibitor je acetilkolinesteraze u beskralješnjacima i kralješnjacima (Cooper NL i Bidwell JR., 2006, Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS ., 2008). Klorpirifos korišten je u raznim *in vivo* testovima toksičnosti na vodenim beskralješnjacima. Dokazano je da smanjuje aktivnost acetilkolinesteraze u *Artemia salina, Artemia parthenogenetica, Biomphalaria glabrata, Corbicula fluminea, Daphnia magna, Gammarus pulex, Lamellidens marginalis, Lumbriculus variegatus, Paratya australiensis, Planorbarius corneus, Potamopyrgus antipodarum,* i *Procambarus clarkii* (Amanullah i sur., 2010, Barata i sur., 2004, Cacciatore i sur., 2011, Cooper i Bidwell., 2006, Gagnaire i sur., 2008, Kumar i sur., 2010, Rodriguez., 2009, Varo´ i sur., 2002, Vioque-Ferna´ndez i sur., 2007, Xuereb i sur., 2007). Neki autori istražili su učinak klorpirifosa na reprodukciju, preživljavanje i embrionalni razvoj u kralješnjacima i beskralješnjacima (De Silva i Samayawardhena., 2005, Farag i sur., 2010, Jager i sur., 2007, Li-Xia i sur., 2009, Palma i sur., 2009, Varo i sur., 2006, Zaliznick i Nugegoda,, 2006). U vodenbuhi *Daphina mgna* klorpirifos uzrokuje smanjenje potomaka i anomalije oko razvoja jajašca (Palma i sur., 2009).

Acetilkolinesteraza specifičan je biomarker učinka organofosfornih pesticida na žive organizme no svakako je potrebno istražiti učinak organofosfornih pesticida i na druge enzimske sustave,tkiva,organe te na koncu organizme i populacije.

E. Patetsini i suradnici (2013) dokazali su u svojem istraživanju da niske koncentracije pesticida uzrokuju promjene u stabilnosti lizosomalne membrane u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck., 1819). U skladu s tim rezultatom, dokazano je da klorpirifos utječe na fiziologiju školjkaša, ekspresiju gena i prijenos signala (Franzellitti i sur.,2011). Niske koncentracije pesticida u okolišu imaju štetne učinke na molekulu DNA, enzimske sustave i fiziološki status morskih organizama (Franzellitti i sur.,2011).

Određivanje učinka toksičnih pojeva

2.1. Bakterijski testovi toksičnosti

Testovi toksičnosti temelje se na izlaganju, odnosno ispitivanju učinka različitih toksičnih tvari na test organizme. Testovi uključuju korištenje prokariota i eukariota. Bakterije su često korištene u različitim toksikološkim ispitivanjima među kojima je određivanje utjecaja onečišćenja na toksičnost uzoraka iz morskog okoliša. Luminiscentne bakterije najčešće su korištene za određivanje toksičnog utjecaja (Schiewe i sur.,1985, Bihari i sur., 1989, Miller i sur., 1999, Cooper, 2001, Onorati i Mecozzi., 2004). Microtox test ukazuje na prisutnost organskog onečišćenja kao i onečišćenja metalima.

To je brza, standardizirana i jeftina metoda mjerenja smanjenja bioluminiscencije bakterije *Vibrio fisheri* u prisustvu toksikanta, te je kao takva široko korištena kao marker akutne toksičnosti (Bulich., 1986).

U dosadašnjim testovima Microtox je korišten za određivanje toksičnosti dagnji na područjima u Grčkoj pod snažnim utjecajem rafinerijskih otpadnih voda kao i pod utjecajem onečišćenja iz komunalnih voda (Cotonu i sur., 2002). Određivanje toksičnosti tkiva dagnje u Riječkom zaljevu opterećenom PH-ovima, dokazalo je korelaciju između porasta toksičnosti i smanjenje općeg fiziološkog statusa organizma (Bihari i sur., 2007).

2.2. Bioindikatorski organizmi – dagnja *Mytilus galloprovincialis*

Morski školjkaši kao što su to dagnje široko su korišteni kao bioindikatorski organizmi za praćenje učinaka ksenobiotika budući da kao filtratorski organizmi sposobni su akumulirati široki rang zagađivala iz okolne vode (M. N. Canty, J. A. Hagger, R. T. B. Moore, L. Cooper, and T. S. Galloway., 2007). Najčešće korišteni bioindikatorski organizam je dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck,1819) zbog njezine široke rasprostranjenosti i lake dostupnosti. Imaju važnu ekonomsku i ekološku ulogu i lako se prilagođavaju promjenama okolišnih čimbenika. U okolišne čimbenike koji mogu utjecati na fiziologiju dagnji ubrajamo abiotske (temperatura,izlaganje zraku i salinitet) (Phillips., 1976, Cossa i sur., 1979, Davies i Pirie,, 1980) i antropogene (Livingstone., 1991). Koncentracija kemikalija može u tkivima dagnje dostići i do 1000 puta veću vrijednost nego u morskoj vodi. Zbog takve sposobnosti škrge su kao promatrani organ koji je kontinuirano direktno izložen djelovanju zagađivala izabrane kao modelno tkivo.

Osim škrga ciljano tkivo je također probavna žlijezda koja ima ulogu detoksikacijskog organa. Za svrhe biomonitoringa istraženi su mnogi enzimski sustavi kao biomarkeri zagađenja vodenog okoliša. Biomarkeri su mjerljivi signali fizioloških, biokemijskih i histoloških promjena u staničnim procesima ili strukturama.Govore o tome dal je zagađivalo ušlo u organizam i izazvalo štetni učinak. Opći biomarkeri daju odgovor na sve vrste stresa dok specifični biomarkeri specifični su za specifična zagađivala. Biomarkeri pokazuju biološki odgovor dagnji na zagađenje na raznim razinama: od cijelog organizma pa sve do razine makromolekula. Opće poznati biomarkeri su oksigenaza miješanih funkcija (OMF) (Minier i sur., 2000), inhibicija acetilkolinesteraze (Coppage i Braidech., 1976) i sinteza metalotioneina (Roch i sur., 1982). U Jadranu dagnja je najistraživaniji organizam u području ekotoksikologije i korištena je u mnogobrojnim biomonitoring istraživanjima uključujući i desetogodišnje istraživanje utjecaja onečišćenja na morski ekosustav na hrvatskoj strani Jadrana - ″Projekt Jadran″ (Bihari i sur., 2003, Jakšić i sur., 2005, Klobučar i sur., 2008, Kanduč i sur., 2011, Perić i sur., 2012a, Štambuk i sur., 2013),.

2.3. Kisele DNaze

U posljednje vrijeme enzimski sustavi odgovorni za metabolizam nukleinskih kiselina istraženi su kao enzimi odgovorni za metabolizam ksenobiotika (Menzorova i Rassakazov 2007). Istražen je odgovor kiselih DNaza u slatkovodnom pužiću *Viviparus viviparus* izlaganome toksičnim industrijskim zagađivalima (Popov i sur., 2003) i dagnji *Mytilus galloprovincialis* (Fafanđel i sur., 2008). Kisele DNaze su hidrolitički enzimi koji cijepaju fosfodiestersku vezu nukleinskih kiselina, najstabilniju vezu pronađenu u biološkim sustavima (Baranovskii i sur., 2004). Locirane su u lizosomima a pH optimalnog djelovanja je 4.5 – 5.5 (Evans i Aguilera., 2003). Uloga kiselih DNaza bitna je za vrijeme razgradnje DNA fagolizosomima za vrijeme infekcija i za razgradnju apoptotičnih stanica fagocitnim stanicama. Aktivnost kiselih DNaza u morskim beskralješnjacima prvi put je izmjerena prije 40 godina (Rasskazov i sur., 1975). U recentnim radovima aktivnost kiselih DNaza je izmjerena u spužvama (Shpak i sur., 2008; Fafanđel i sur., 2010) i školjkašima (Bihari i sur., 2007, Fafanđel 2008). Prethodna istraživanja aktivnosti kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi dagnji ukazuju na to da DNaze daju odgovor na smjese zagađivala u okolišu i modelnim zagađivalima te da može poslužiti kao biomarker zagađenja morskog okoliša (Fafanđel i sur., 2008).

CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je:

a) utvrditi učinak različitih koncentracija pesticida kloropirifosa na aktivnost kisele DNaze u škrgama i probavnoj žlijezdi dagnje;

b) utvrditi toksičnost tkiva dagnje pod utjecajem različitih koncentracija pesticida;

c) usporediti učinak različitih koncentracija pesticida na enzimsku aktivnost DNaza i toksičnost tkiva;

U skladu s postavljenim ciljevima hipoteza je: postoji dozni odgovor na toksičnosti na razini enzima i na testu toksičnosti?

MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije: Tris, EDTA, Triton X-100, PMSF, BSA, bezvodni bakrov (II) sulfat, natrijev - kalijev tartarat, Folin – Ciocalteus otopina, natrijev hidroksid, natrijev karbonat, PicoGreen, . Sve navedene kemikalije su analitičke čistoće i nabavljene kod KEMIKE Zagreb.

Pesticid komercijalnog imena klorpirifos (O,O-dietil O – 3,5,6 – trikloropiridin-2-il fosforotioat).

Bakterija *Vibrio fisheri*, rekonstitucijski pufer, otopina medija za rast bakterija i otopina za razrjeđenje nabavljene su kod Macherey - Nagel, Njemačka.

3.2. Izlaganje dagnje toksikantu

Za ovo istraživanje korištene su dagnje iz uzgajališta u Limskom zaljevu. U protočnim bazenima jedinke dagnje su aklimatizirane tri dana. Po deset jedinki smješteno je u 8 bazena. Jedna skupina nije izlagana toksikantu, niti nosiocu toksikanta. Druga skupina izložena je acetonu (otapalu za pesticid), 1 ml acetona u 30 L morske vode. Dagnje u ostalih šest bazena izlagane su različitim količinama pesticida otopljenim u 1 ml acetona do finalnih 0,03 μg/L, 0,1 μg/L, 1 μg/L, 5 μg/L, 10 μg/L, 100 μg/L. U istraživanju toksikant je pesticid komercijalnog imena klorpirifos (O,O-dietil O – 3,5,6 – trikloropiridin-2-il fosforotioat). Dagnje u ostalih šest bazena izlagane su različitim koncentracijama datog pesticida (0,03 μg/L, 0,1 μg/L, 1 μg/L, 5 μg/L, 10 μg/L, 100 μg/L). Dagnje su nakon 96 h izlaganja secirane, izdvojena je probavna žlijezda i škrge za mjerenje aktivnosti kisele Dnaze a plašt, gonade i ostala meka tkiva služiti će za određivanje toksičnosti tkiva. Sva tkiva pohranjena su na -80 °C.

3.3. Homogenizacija tkiva

Probavna žlijezda i škrge homogenizirani su ručnim Politron homogenizatorom (Kinematica, Švicarska) na ledu u (1:3; w:v) hladnom lizirajućem puferom (10mM Tris, 20 mM EDTA, 0,5 % Triton X – 100, 2mM PMSF). Homogenati su centrifugirani na 10 000 g, 30 minuta na temperaturi 4 °C. Dobiveni supernatanti alikvotirani su i zamrznuti na – 80 °C.

3.4. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-u

Količina proteina u supernatantu određivana je prema Lowry-u (1951.). Za izradu standardne krivulje korištena je serija razrijeđenja BSA. Pripremljene su stock otopine s uzorcima. U svaki uzorak i razrijeđenje BSA dodana je otopina A (1 ml 1% CuSO4, 2ml 2% K,Na – tartarat u 1000 ml 2% Na2CO3 u 0,1 M NaOH). Inkubacija traje 10 minuta. Nakon otopine A dodaje se otopina B (50:50 dH2O:Folin-ov reagens), inkubacija traje 30 minuta. Po 200 µl uzorka i standarda nakon inkubacije prebaceno je u mikrotitarske pločice. Apsorbancija je mjerena u spektrofotometru.

3.5. Određivanje aktivnosti kiselih Dnaza

Aktivnosti kiselih DNaza u proteinskim ekstraktima probavne žlijezde i škrga određena je fluorimetrijski prema Fafanđel i sur. (2008). Postupak se temelji na promjeni intenziteta fluorescencije zbog smanjenja količine kompleksa dsDNA- PicoGreen® zbog hidrolize DNA kao supstrata nakon djelovanjem kiselih DNaza proteinskog ekstrakta. PicoGreen® je cijanidna boja koje se specifično veže na dvolančanu DNA a kompleks boje i dsDNA fluorescira. Za određivanje kiselih DNaza u škrgama i probavnoj žlijezdi dagnji pripremljena je reakcijska smjesa: 10 µl homogenata u 80 µl natriji acetatnom puferu (pH 5.5). Reakcija hidrolize je započela dodavanjem 10µl otopine dvolančane DNA (0,02µg/µl). Smjesa je inkubirana na 37 °C, 30 minuta. Nakon inkubacije dodano je 100 µl PicoGreen boje otopljene u TE puferu (1:200 TE) , do ukupnog volumena od 200µl u jažicama neposredno pred mjerenje. Promjena fluorescencije (ΔF) izračunata je oduzimanjem izmjerene fluorescenecije negativne kontrole (F0) od vrijednosti fluorescencije u sirovom uzorku (Fu). Negativnu kontrolu predstavlja proteinski ekstrakt u kojem je inaktivirana DNaza kuhanjem uzorka na 95° C, 30 minuta. Intenzitet fluorescencije mjeren je u čitaču mikrotitarskih ploča (Fluoroscan Ascent Microplate Reader, Labsystem Finland). Instrument je opremljen kombinacijom filtera koji omogućava ekscitaciju pri valnoj duljini od 485nm i emisiju kod 520 nm. Rezultati su prikazani kao specifična enzimska aktivnost (ΔF mg−1 min−1).

3.6. Određivanje toksičnosti tkiva Microtox® – testom

Uzorci tkiva dagnje homogenizirani su električnim homogenizatorom na ledu. Odvagano je 1 g mekog tkiva na 3 ml otopine za razrijeđenje.Meko tkivo je nasumično uzeto od svih 10 jedinki korištenih u pokusu. Homogenati su centrifugirani na 15 minuta 2000 okretaja i 4 °C. Toksičnost je određivana u supernatantu. Toksičnost tkiva je određena mjerenjem smanjenja bioluminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* za različita razrjeđenja supernatanta u scintilacijskom analizatoru.

Liofiliziranim bakterijama dodano je 500 µl komercijalnog rekonstitucijskog pufera te inkubirano 15 minuta na 4 °C. Suspenziju bakterija prebacena je na zadano mjesto u instrumentu. Izmjerena je početna luminiscencija bakterija u svakoj u nizu od 7 epruveta . U drugom nizu od 7 epruveta,u prvu je dodano 1000 µl komercijalne otopine za razrijeđenje a idučih 6 po 500 µl. U prvu test tubu dodano je 500 µl homogenata tkiva. Napravljena su 6 sukcesivna 1:2 razrjeđenja. U sedmoj tubici nema uzorka, već 1 ml pufera za razrjeđivanje te služi kao kontrola. Nizu epruveta s bakterijama je dodan uzorak razrjeđenja, u svako po jedno, te nakon 15 minuta izmjerena je završna luminiscencija za svako razrjeđenje i kontrolu svih setova uzoraka. Toksičnost svih uzoraka mjerena je u duplikatu. Promjena luminiscencije mjerena je u instrumentu softverskim vođenem u tubama bez uzorka i s uzorkom. Rezultat mjerenja je EC50 – koncentracija toksikanta (razrjeđenje supernatanta) koja uzrokuje 50% smanjenja bioluminiscencije uz pripadajući interval pouzdanosti 95%. Ukoliko se lumniscencija ne spusti ispod 50% vrijenosti početne fluorescencije rezultat testa je negativan.

3.7. Statistička obrada rezultata

Za statističku analizu i grafičke prikaze korišten je program Statistica (StatSoft Inc., USA). Aktivnost kisele DNaze prikazana je box plot dijagramom.

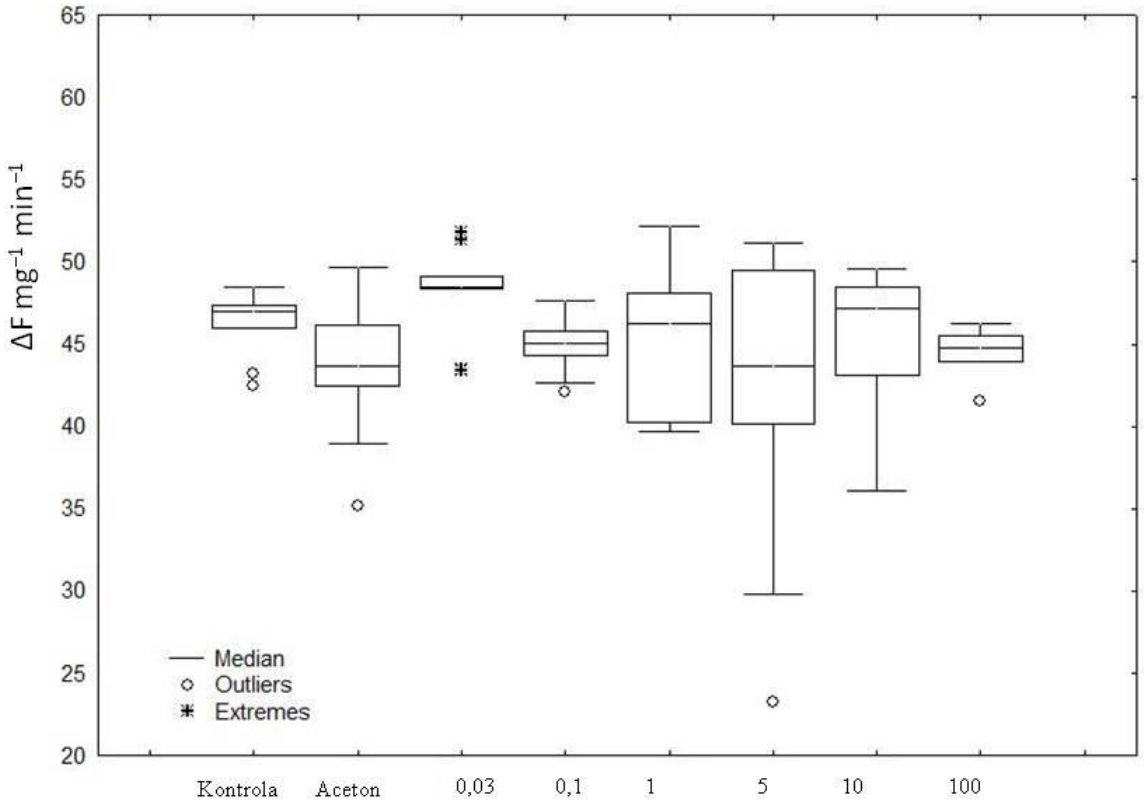
Statistički značajne razlike između uzoraka određene su Mann - Withney neparametrijskim testom, uz razinu značajnosti od $p < 0,05$.

REZULTATI

4.1. Aktivnosti kisele DNaze

a) Probavna žlijezda

Aktivnost kiselih DNaza (ΔF mg−1 min−1) u probavnoj žlijezdi dagnje nakon izlaganja različitim koncentracijama pesticida prikazana je na slici 1. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 43,69 mg−1 min−1 za dagnje izlagane acetonu do 48,47 mg−1 min−1 za dagnje izlagane najmanjoj koncentraciji pesticida 0,03 μg/l.



Slika 1. Box- plot dijagram aktivnost kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi dagnji u kontrolnoj grupi,dagnjama izloženim acetonu i različitim koncentracijama pesticida (0,03 μg/l, 0,1 μg/l, 1 μg/l, 5 μg/l, 10 μg/l, 100 μg/l).

Postoje statistički značajne razlike (< 0,05) u enzimskoj aktivnosti između kontrole i koncentracija klorpirifosa: 0,03µg/l, 0,1µg/l te kontrole i najveće koncentracije pesticida, 100µg/l (Tablica 1.). Najmanja koncentracija pesticida 0,03µg/l uzrokuje porast enzimske aktivnosti u odnosu na kontrolu. Koncentracija pesticida 0,1µg/l i 100 µg/l uzrokuje smanjenje enzimske akivnosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajna razlika prisutna je između acetona i najmanje koncentracije pesticida 0,03µg/l. Dagnje tretirane acetonom imaju najmanju enzimsku aktivnost. Povećanjem koncentracije od 0,1 µg/l, 1 µg/l, 5 µg/l do100µg/l vidljiv je pad aktivnosti u odnosu na kontrolu ali je statistički značajan porast aktivnosti DNaza u odnosu na kontrolu izmjeren samo za koncentracije od 0,03 µg/l i 10µgl.

Talica 1. U tablici prikazane su statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u aktivnosti kiselih DNaza probavne žlijezde između kontrole, acetona i različitih koncentracija pesticida klorpirifosa.

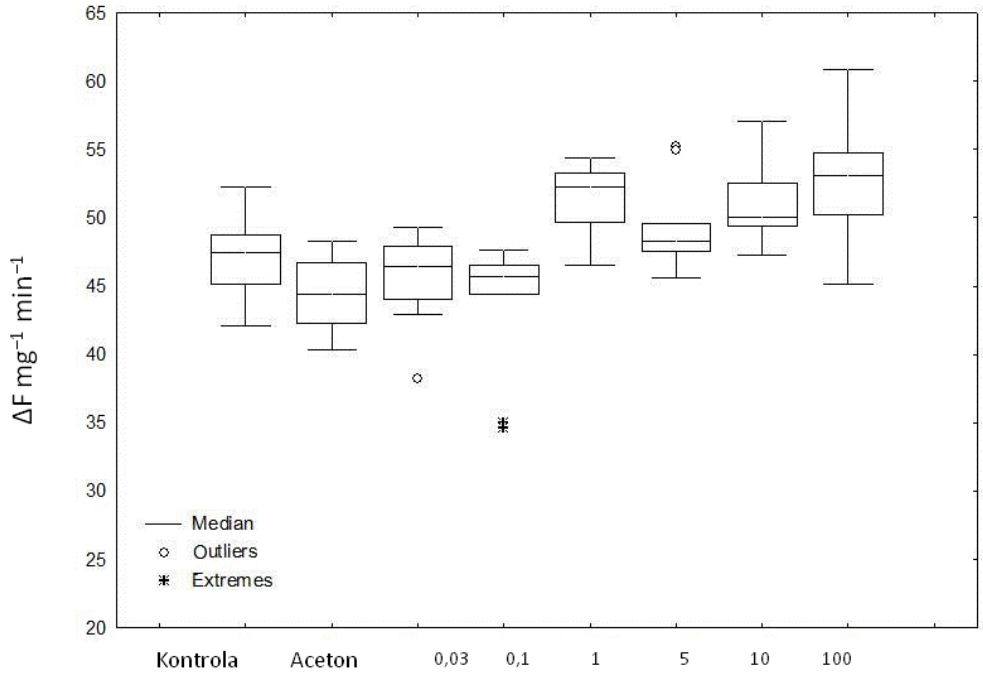
	Aceton	Koncentracije klorpirifosa					
	0,003µg/l	0,03 µg/l	0,1 µg/l	1 µg/l	5 µg/l	10 µg/l	100 µg/l
Kontrola		*	*				*
Aceton		*					

Aktivnost kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi dagnji u kontrolnoj grupi,dagnjama izloženim acetonu i različitim koncentracijama pesticida (0,03 µg/l, 0,1 µg/l, 1 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l). SV- srednja vrijednost, STD- standardna devijacija, CV- koeficijent varijacije.

	SV	STD	CV
Kontrola	46,35	1,98	4,271845
Aceton	43,71	4,40	10,06635
0,03 µg/l	48,19	2,77	5,748081
0,1 µg/l	44,90	1,67	3,717219
1 µg/l	44,97	4,50	10,01092
5 µg/l	41,77	8,98	21,50249
10 µg/l	45,00	4,75	10,56313
100 µg/l	44,38	1,63	3,676765

b) Škrge

Aktivnost kiselih DNaza (ΔF mg−1 min−1) u škrgama dagnje prikazana je na Slici 2. Dobivene vrijednosti kreću se od 44,37 mg−1 min−1 za dagnje izlagane acetonu do 53,11 ΔF mg−1 min−1 za dagnje izlagane najvećoj koncentraciji pesticida od 100µg/l.



Slika 2. Aktivnost kiselih DNaza u škrgama dagnje u kontrolnoj grupi,dagnjama izloženim acetonu i različitim koncentracijama pesticida klorpirifosa (0,03 µg/l, 0,1 µg/l, 1 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l).

Sa statistički značajnom razlikom ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu izdvaja se aktivnost kiselih DNaza u škrgama pod utjecajem acetona, najmanje koncentracije pesticida 0,03 µg/l, 10 µg/l i najveće koncentracije pesticida 100 µg/l. Statistički značajna razlika u odnosu na aceton koji je nosilac pesticida izdvajaju se na koncentracijama 1 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l i najvećoj koncentraciji pesticida 100 µg/l. U odnosu na kontrolu enzimska aktivnost slijedećih koncentracija je u porastu 1µg/l, 5µg/l, 10µg/l i 100 µg/l.

Talica 2. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u specifičnoj aktivnosti kiselih DNaza u škrgama između kontrole,acetona i različitih koncentracija pesticida.

	Aceton		Koncentracije klorpirifosa				
	0,003µg/l	0,03 µg/l	0,1 µg/l	1 µg/l	5 µg/l	10 µg/l	100 µg/l
Kontrola	*	*				*	*
Aceton				*	*	*	*

Aktivnost kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi dagnji u kontrolnoj grupi,dagnjama izloženim acetonu i različitim koncentracijama pesticida (0,03 µg/l, 0,1 µg/l, 1 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l). SV- srednja vrijednost, STD- standardna devijacija, CV- koeficijent varijacije.

	SV	STD	CV
Kontrola	47,18	3,06	6,476732
Aceton	44,26	2,50	5,641531
0,03 µg/l	45,58	3,23	7,087232
0,1 µg/l	43,76	4,81	10,98908
1 µg/l	51,44	2,55	4,959846
5 µg/l	49,21	3,36	6,826771
10 µg/l	51,13	2,98	5,829581
100 µg/l	52,93	5,27	9,956508

4.2. Toksičnost tkiva

Akutne toksičnosti tkiva mjerena je u homogenatima jedinki dagnje izlaganim različitim koncentracijama pesticida a rezultati su prikazani u Tablici 3. Rezultati testa su negativni u kontrolama, jedinu pozitivni rezultat je utvrđen za uzorak dagnje izlagane najvećoj koncentraciji pesticida (100µg/l).

Tablica 3. Toksičnost uzoraka tkiva dagnji

Kontrola (K)	Aceton (A)	Koncentracije klorpirifosa					
		0,03 µg/l	0,1 µg/l	1 µg/l	5 µg/l	10 µg/l	100 µg/l
-	-	-	-	-	-		+

RASPRAVA

U ovom radu istraživan je biološki odgovor dagnje *Mytilus galloprovincials* na prisutnost pesticida klorpirifosa mjerenjem enzimske aktivnosti kiselih DNaza u probavnoj žlijezdi i škrgama te toksičnosti tkiva.

Klorpirifos uzrokovao je promjene aktivnosti kiselih DNaza u škrgama i probavnoj žlijezdi dagnje. Promjena u akitvnosti kiselih DNaza može se povezati s time da male koncentracije klorpirifosa 0,05µg/l uzrokuju promjene stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnji (Patetsini i sur. 2013). Na aktivnost kiselih DNaza utjecao je i otapalo pesticida - aceton koji je u oba tkiva snizio enzimsku aktivnost. Snižavanje enzimske aktivnosti djelovanjem organskog otapala dokazao je Canty i suradnici 2007.

U probavnim žlijezdama nije zabilježen dozni odgovor kisele DNaze na koncentracije pesticida. U odnosu na kontrolu aktivnost kiselih DNaza u probavnim žlijezdama je promjenjiva neovisno o koncentraciji pesticida. Takve promjene enzimske aktivnosti povezane su s time da organofosforni pesticidi uzrokuju promjene u metabolizmu stanica u vrlo kratkom vremenu (Cao i suradnici 1999). Različiti odgovori na koncentracije pesticida mogu biti uzorak indukcije sinteze različitih enzimskih sustava za detoksikaciju stanice. Aktivnosti kiselih DNaza u škrgama raste u odnosu na kontrolu. Primjecen je dozni odgovor na koncentracije pesticida. Povećanje aktivnosti kiselih DNaza s povećanjem koncentracije pesticida ukazuje na ubrzani metabolizam nukleinskih kiselina u škrgama zbog toga što dolazi do oštećenja molekule DNA uslijed izlaganja dagnji klorpirifosu (Patetsini i suradnici 2013).

Porast aktivnosti DNaza u škrgama i promjene aktivnosti DNaza u odnosu na kontrolu u probavnoj žlijezdi ukazuju da je odgovor enzima na klorpirifos tkivno speifičan. Promjena aktivnosti kiselih DNaza u škrgama u ovom slučaju je bolji biomarker učinka od probavne žlijezde. Takav rezultat je u skladu s prethodnim istraživanjem da se aktivnost kiselih DNaza u škrgama sa čistog i zagađenog područja bitno razlikovala (Kovačić i suradnici 2015).

Na bakterijskom testu toksičnosti samo najveća koncentracija pesticida ima učinak na smanjenje bioluminiscencije bakterija. Zbog svog načina života dagnje kao filtratorski organizmi filtriraju velike količine vode i tako unose i zagađivala koja se akumuliraju i raste njihova koncentracija u tkivima. Serrano i suradnici (1997) istražili su sposobnost bioakumulacije organofosfornih pesticida u dagnjama. U njihovim rezultatima da je klorpirifos akumuliran u vecim koncentracijama u odnosu na ostale pesticide u tom pokusu. Bioakumulacija klorpirifosa u dagnjama može ovisiti o molekularnoj težini pesticida i obliku u kojem se on nalazi u okolišu (Serrano i sur., 1997). Negativni odgovori na bakterijskom testu toksičnosti u malim koncentracijama pesticida mogući su razlog tome da se male koncentracije sporije akumuliraju u tkivima.

Microtox® je dobra metoda za određivanje akutne toksičnosti tkiva ali da nije dovoljno osjetljiva kako bi detektirala toksični učinak i najmanje koncentracije pesticida i one koje su prisutne u okolišu. Aktivnost kiselih DNaza je osjetljivija metoda mjerenja učinka pesticida kloropirifosa od bakterijskoj testa toksičnosti što je za očekivati budući da su dagnje i bakterije na različitim razinama organizacije živog svijeta i učinak neurotoksičnog agensa poput kloropirifosa će se razlikovati.

Rezultati u ovom radu poslužiti će kao izvor za daljnja istraživanja u području fiziologije i ekotoksikologije morskih organizama. Dagnja je dobar bioindikatorski organizam jer analizom tkiva i makromolekula možemo dobiti puno informacija o okolišu u kojem organizam živi. Primjenu kiselih DNaza kao biomarkera u biomonitoringu potrebno je svakako nastaviti istraživati. Kisele DNaze nisu specifični biomarker za pojedine vrste zagađivala kao što su to metalotioneini za teške metale i inhibicija acetilkolinesteraze za organofosforne pesticide. U dosadašnjim istraživanjima sva zagađivala uzrokuju promjenu u njezinoj aktivnsoti u odnosu na kontrolu (Popov 2003, Fafanđel i sur., 2008).

Učinak drugih vrsta zagađivala na promjene kisele DNaze u škrgama i probavnoj žlijezdi dagnji svakako je potrebno nastaviti i tražiti moguce korelacije između promjena drugih enzimskih sustava ili oštećenja markomolekula. Promjena aktivnosi kiselih DNaza u terenskim istraživanjima može biti dobar biomarker stresa u morskom ekosustavu. Bakterijski test toksičnosti iako je brza i standardna metoda nije dovoljno osjetljiv za, potrebno je uzeti i druge parametre u obzir ukoliko se želi mjeriti učinak zagađivala na biološke sustave.

ZAKLJUČCI

Dobivenim rezultatima i njihovom obradom zaključujemo slijedeće:

1. Prisutnost pesticida kloropirifosa utječe na aktivnost kisele DNaze u tkivima dagnje. Odgovor je tkivno specifičan: u probavnoj žlijezdi nema a u škrgama postoji dozni odgovor.

2. Samo najveća istraživana koncentracija kloropirifosa (100 μg/L) pokazuje pozitivni odgovor u bakterijskom testu toksičnosti:

3. Aktivnost kisele Dnaze je osjetljiviji pokazatelj učinka pesticida u dagnji *Mytilus galloprovincialis* od bakterijskog testa toksičnosti (Microtox®);

LITERATURA

Amanullah, B., Stalin, A., Prabu, P., Dhanapal, S., 2010. Analisis of AChE and LDH in mollusc, Lamellidens marginalis after exposure to chlorpirifos. J. Environ. Biol. 31, 417–419.

Arufe, M.I., Arellano, J.M., Garcı´a, L., Albendı´n, G., Sarasquete, C., 2007. Cholinesterase activity in gilthead seabream (Sparus aurata) larvae: characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. Aquat. Toxicol. 84, 328–336.

Aspelin AL, Grube AH. 1999. Pesticides industry sales and usage 1996 and 1997 market estimates. 733-R-99-001. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Aspelin AL. Pesticide industry sales and usage: 1992 and 1993 market estimates. 733-K-94-001. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, US Environmental Protection Agency; 1994.

B. Bayne, M. N. Moore, J. Widdows, D. R. Livingstone, and P. Salkeld, "Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve mollusks," Philosophycal Transcript of Royal Society of London B, vol. 286, no. 1015, pp. 563–581, 1979.

B. J. Richardson, E. Mak, S. B. De Luca-Abbott, M. Martin, K. McClellan, and P. K. S. Lam, "Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (Perna viridis): do mussels "integrate" biomarker responses?" Marine Pollution Bulletin, vol. 57, no. 6–12, pp. 503–514, 2008.

Baranovskii, A.G., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A., Human Deoxyribonucleases. A Review, Biokhimiya, 2004, vol. 69, no. 6, pp. 725 -742.

Barata, C., Solayan, A., Porte, C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to Daphia magna. Aquat. Toxicol. 66, 125–139.

Bihari Nevenka, Maja Fafanđel, Lorena Perić „Tissue distribution of neutral deoxyribonuclease (Dnase) activity in the mussel Mytilus galloprovincialis" Comparative Biochemistry and Physiology (2007) 550 – 556.

Cacciatore, L.C., Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N., Cocho´n, A., 2012. Binary mixtures of azinphos-methyl oxon and chlorpyrifos oxon produce in vitro synergistic cholinesterase inhibition in Planorbarius corneus. Chemosphere 88, 450–458.

Cacciatore, L.C., Villar, M.R., Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., Cocho´n, A., 2011. Inhibicio´n in vivo de la actividad colinesterasa en tejidos blandos de un gastro´podo de agua dulce por el carbaril y mezclas binarias del mismo con metilazinfos o clorpirifos. Acta Toxicol. Argent. (19), 98–99.

Canesi, L., Negri, A., Barmo, C., Banni, M., Gallo, G., et al., 2011. The Organophosphate Chlorpyrifos Interferes with the Responses to 17-Estradiol in the digestive gland of the marine mussel Mytilus galloprovincialis. PLoS One 6 (5), e19803.

Cao, C.J., Mioduszewski, R., Menking, D., Valdes, J., Katz, E., Eldefrawi, M., Eldefrawi, A., 1999. Cytotoxicity of organophosphate anticholinesterases. In vitro Cell Dev. Biol.- Animal 35, 493-500.

Castro, Peter, and Michael E.Huber. Marine Biology. 8th. New York: McGraw-Hill Companies Inc., 2010. Print.

Collin, H., Meistertzheim, A.L., David, E., Moraga, D., Boutet, I., 2010. Response of the Pacific oyster Crassostrea gigas. Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. Journal of Experimental Biology 213, 4010–4017.

Cooper NL, Bidwell JR: The use of cholinesterase activity and ecologicallyrelevant behavioral parameters to indicate chlorpyrifos exposure in the Asian clam, Corbicula fluminea. Aquatic Toxicol 2006, 76:258-267.

Cooper, N.L., Bidwell, J.R., 2006. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, Corbicula fluminea, after exposure to an organophosphate insecticide. Aquat. Toxicol. 76, 258–267.

D. A. Apeti, G. G. Lauenstein, J. D. Christensen et al., "A historical assessment of coastal contamination in Birch Harbor, Maine based on the analysis of mussels collected in the 1940s and the Mussel Watch Program," Marine Pollution Bulletin, vol. 60, no. 5, pp. 732–742, 2010.

De Silva, P.M.C.S., Samayawardhena, L.A., 2005. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (Poecilia reticulata). Chemosphere 58, 1293–1299.

Derache R. 1977. Organophosphorus Pesticides: Criteria (Dose/ Effect Relationships) for Organophosphorus Pesticides. Pergamon, Oxford, UK.

Dondero, F.,Banni,M.,Negri,A.,Boatti, L., Dagnino,A.,Viarengo,A.,2011.Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. BMC Genomics 12, 195, http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-195.

E. Patestini, V.K. Dimitriadis, M. Kaloyianni „Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticide, chlorpyrifos and penoxsulam“ Aquatic Toxicology 123 (2013) 338-345.

E.P.A. USEPA: Interim Registration Eligibility Decision for Chlorpyrifos, 2006.

Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS: Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. Crit Rev Toxicol 2008, 38:1-125.

Edwards CA, Fisher SW. 1991. The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In Mineau P, ed, Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment, Vol 2: Chemicals in Agriculture. Elsevier, New York, NY, USA, pp 255–275.

Escartin, E., Porte, C., 1996. Bioaccumulation, metabolism, and biochemical effects of the organphosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 915–920.

Evans, C.J., Aguilera, RJ., 2003. Dnase II: genes, enzymes and function. Gene 322, 1-15.

Farag, A.T., Radwan, A.H., Sorour, F., El-Okazy, A., El-Agamy, E.S., El-Sebal, A.E.K., 2010. Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. Reprod. Toxicol. 29, 80–85.

Ferrari, A., Venturino, A., Pechen, D.., Angelo, A.M., 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphos methyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 57, 420–425.

Franzellitti, S., Capuzzo, A., Viarengo, A., Fabbri, E., 2011. Interactive effects of nickel and chlorpyrifos on Mediterranean mussel cAMP-mediated cell signalling and MXR-related gene expressions. Comparative Biochemistry and Physiology C: Comparative Pharmacology 154, 377–382.

Franzellitti, S., Capuzzo, A., Viarengo, A., Fabbri, E., 2011. Interactive effects of nickel and chlorpyrifos on Mediterranean mussel cAMP-mediated cell signalling and MXR-related gene expressions. Comparative Biochemistry and Physiology C: Comparative Pharmacology 154, 377–382.

Grue CE, Hart ADM, Mineau P. 1991. Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife. In Mineau P, ed, Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment, Vol 2: Chemicals in Agriculture. Elsevier, New York, NY, USA, pp 152–209.

I. Kovačić, M. Fafanđel i N. Bihari, "Lysosomal deoxyribonuclease II from the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Characterization and seasonal activity" Marine biology Research 2015.

J.C.Sanchez – Hernandez i sur. „Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm Aporrectodea caliginosa „ Science of the Total Environment 490 (2014) 445-455.

Jager, T., Crommentuijn, T., van Gestel, C.A.M., Kooijman, S.A.L.M., 2007. Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail Folsomia candida. Environ. Pollut. 145, 452–458.

Jakšić, Ž., Batel, R. (2003) DNA integrity determination in marine invertebrates by Fast Micromethod®. Aquatic Toxicology. 65:361-376.

Jakšić, Ž., Batel, R., Bihari, N., Mičić, M., Zahn, R.K. (2005) Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination - A long-term field study. Marine Pollution Bulletin. 50:1314-1327.

Kanduč, T., Medaković, D., Hamer, B. (2011) *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of environmental conditions: the case of the eastern coast of the Adriatic Sea. Isotopes in Environmental and Health Studies. 47:42-61.

Klobučar, G.I., Štambuk, A., Hylland, K., Pavlica, M. (2008) Detection of DNA damage in haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* in the coastal ecosystems of Kaštela and Trogir bays, Croatia. Science of the Total Environment. 405:330-337.

Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., Peche´n de D0 Angelo, A.M., Cocho´n, A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicology 222, 185–194.

Kumar, A., Doan, H., Barnes, M., Chapman, J.C., Kookana, R.S., 2010. Response and recovery of acethylcholinesterase activity in freshwater shrimp Paratya P.R. Rivadeneira et al. / Ecotoxicology and Environmental Safety 90 (2013) 82–88 87 australiensis (Decapoda: Atyidae) exposed to selected anti-cholinesterase insecticides. Ecotoxicol. Environ. Saf, 1503–1510
Lemus, R., Abdelghani, A., 2000. Chlorpyrifos: an unwelcome pesticide in our homes. Reviews on Environmental Health 15, 421–433.

Li-Xia, K., Yi-Long, X., Chun Wang, Z., Li-Li, D., 2009. Effects of three organophosphorus pesticides on population, growth and sexual reproduction of rotifer Brachionus calyciflorus Pallas. Acta Entomol. Sinica. 29, 182–185.

M. N. Canty, J. A. Hagger, R. T. B. Moore, L. Cooper, and T. S. Galloway, "Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*," Marine Pollution Bulletin, vol. 54, no.4, pp. 396–402, 2007.

M. N. Canty, J. A. Hagger, R. T. B. Moore, L. Cooper, and T. S. Galloway, "Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*," Marine Pollution Bulletin, vol. 54, no. 4, pp. 396–402, 2007.

M. N. Canty, J. A. Hagger, R. T. B. Moore, L. Cooper, and T. S. Galloway, "Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*," Marine Pollution Bulletin, vol. 54, no. 4, pp. 396–402, 2007.
M.N. Canty, J.A. Hagger, R.T.B. Moore, L. Cooper, T.S. Galloway „Sublethal impacz of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edilus*" Marine Pollution Bulletin 54 (2007) 396-402.

Maja Fafanđel, Nevenka Bihari, Lorena Perić, Arijana Cenov, "Effect of marine pollutants on the acid Dnase activity in the hemocytes and digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*" Aquatic Toxicology, 508-513(2008).
Menzorova NI, Rassakazov VA. 2007 „Evaluation of the ecological state of the Sea of Japan and the sea of Okhotsk using the DNase test system" Oceanology 49: 842-32.

Menzorova NI, Rassakazov VA. 2007. „Application of different test system and biochemical indicators for environmental monitoring of the Troitsa Bay, Sea of Japan" Russian Jornual of Marine Biology 33: 118-24.

Miller GT (2004), *Sustaining the Earth*, 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9, Pages 211-216.
Moore, M.N., 1985. Lysosomal responses to a polynuclear aromatic hydrocarbon in a marine snail: effects of exposure to phenanthrene and recovery. Marine Environment Research 17, 230–233.

Moore, M.N., Lowe, D.M., Livingstone, D.R., Dixon, D.R., 1986. Molecular and cellular indices of pollutants effects and their use in environmental impact assessment. Water Science and Technology 18, 223–232.

Moore, M.N., Pipe, R.K., Farrar, S.V., 1982. Lysosomal and microsomal responses to environmental factors in *Littorina littorea* from Sullom Voe. Marine Pollutution Bulletin 13, 340–345.

Ochi, T., Takahashi, K., Ohsawa, M., 1987. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. Mutation Research 180, 257–266.

Palma, P., Palma, V.L., Ferna´ndez, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R., 2009. Embryo-toxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos in the crustacean

Daphnia magna. Ecotoxicol. Environ. Saf (72), 1714–1718. Racke, 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 131, 1–150.

Palma, P., Palma, V.L., Fernandez, R.M., Bohn, A., Soares, A,M.V.M., Barbosa.
Popov, A.P., Konichev, A.S., Tsvetkov, I.L., 2003. Effect of toxic industrial pollutants on the activity and isoforms of acid DNase in the freshwater snail *Viviparus viviparous* L. Appl. Biochem. Microbiol. 39, 454–458.

R. Anjum, A. Malik „ Evaluation of mutagenicity of wastewater in the vicinity of pesticide industry". Environmental Toxicology and Pharmacology 35 (2013) 284-291.

Racke, 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 131, 1–150.

Rodrı´guez, J., 2009. Efecto del insecticida clorpirifos sobre las actividades de esterasas-B en *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus*. Tesis de licenciatura en Ciencias Biolo´ gicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters 128, 215–228.
Springer,O.P. i sur.: Ekološki leksikon. Barbat, Zagreb 2001.

Spurgeon, D.J., Jones, O.A.H., Dorne, J.-L.C.M., Svendsen, C., Swain, S., Stürzenbaum,S.R., 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. Science of the Total Environment 408, 3725–3734.

Spurgeon, D.J., Jones, O.A.H., Dorne, J.-L.C.M., Svendsen, C., Swain, S., Stürzenbaum, S.R., 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. Science of the Total Environment 408, 3725–3734.
Štambuk, A., Pavlica, M., Malović, L., Klobučar, G. (2008) Persistence of DNA damage in the freshwater mussel Unio pictorum upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. Environmental and Molecular Mutagenesis. 49:217-225.

Toughill K (1999), The summer the rivers died: Toxic runoff from potato farms is poisoning P.E.I. Originally published in Toronto Star Atlantic Canada Bureau.

United States Environmental Protection Agency: Interim Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. Washington; 2002.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149.

Varo´ , I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterization of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to Artemia salina and Artemia parthenogenetica. Chemosphere 48, 563–569.

Vioque-Ferna´ndez, A., Alves de Almeida, E., Lo´ pez-Barea, J., 2007. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (Procambarus clarkii, Crustacea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. Comp. Biochem. Physiol. 145, 404–412.

W. J. Doran, W. G. Cope, R. G. Rada, and M. B. Sandheinrich, "Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (Amblema plicata) by chlorpyrifos: implications for biomonitoring," Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 49, no. 1, pp. 91–98, 2001.

Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J., Geffard, O., 2007. Cholinesterase activity in Gammarus pulex (Crustacea Amphipoda): characterization and effects of chlorpyrifos. Toxicology 236, 178–189.

Zaliznick, L., Nugegoda, D., 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of Daphnia carinata. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 207–214.
Zinkl JG, Lockhart WL, Kenny SA, Ward FJ. 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In Mineau P, ed, Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment, Vol 2—Chemicals in Agriculture. Elsevier, New York, NY, USA, pp 233–254.

TEMELJNA DOKUMENTACIJASKA KARTICA

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Učinak pesticida klorpirifosa na dagnju *Mytilus galloprovincialis*: aktivnost kisele DNaze i toksičnost tkiva

SAŽETAK

U ovom radu istražen je učinak pesticida klorpirifosa na aktivnost kisele DNaze u škrgama i probavnoj žlijezdi i toksičnost tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Mjerenjem aktivnosti kisele DNaze u škrgama i probavnoj žlijezdi dobiven je tkivno specifični odgovor. Aktivnost u probavnoj žlijezdi manja je od aktivnosti u škrgama. Škrge su osjetljivije. Aceton kao nosioc pesticida inhibira aktivnost kiselih DNaza u oba tkiva. Na bakterijskom testu toksičnosti samo najveća koncentracija pesticida daje pozitivne rezultate. Zakljucujemo da je aktivnost kisele DNaze osjetljiviji pokazitelj učinka klorpirifosa na dagnju. Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti za buduća istraživanja učinka zagađivala na promjene aktivnosti kisele DNaze i njezinoj ulozi u monitoringu morskog okoliša.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli i Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: kisele DNaze, toksičnost pesticida, bakterijski test toksičnosti, *Mytilus galloprovincialis*

BASIC DOCUMENTATION CARD

JURAJ DOBRILA UNIVERSITY OF PULA

UNIVERSITY UNDERGRADUATE STUDY PROGRAMME – MARINE SCIENCES

The effect of the pesticide chlorpyrifos on the mussel *Mytilus galloprovincialis*: acid DNase activity and tissue toxicity

Abstract

In this paper, we studied the effect of the pesticide chlorpyrifos on the activity of acid DNase in the gills and digestive gland of mussels Mytilus galloprovincialis. The tissue toxicity assesment is also done. Measuring the activity of acid DNase in the gills and digestive gland was obtained tissue-specific response. Activity in the digestive gland is smaller than the activities in the gills. Gills are more sensitive. Acetone as a carrier of pesticides inhibit acid DNase in both tissues. For bacterial toxicity test only the biggest concentration of pesticides gives positive results. We conclude that the activity of acid DNase is more sensitive indicator of the impact of the pesticide than the bacterial toxicity test. The results of this research can be used for further study of the effects of contaminants on the changes of acid DNase and its role in the monitoring of the marine environment .

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrile University of Pula and Ruđer Bošković Institute in Rovinj. Original in Croatian.

Key words: acidic DNase , pesticide toxicity , bacterial toxicity test , *Mytilus galloprovincialis*