

# Utjecaj fungicida Pyrus 400 SC na ponašanje, aktivnost enzima i aktivnost efluks crpke u gujavici *Eisenia andrei*

---

Hmura, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:762536>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-13**



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 Biologija; smjer: znanstveni

Marija Hmura

**Utjecaj fungicida Pyrus 400 SC na ponašanje, aktivnost enzima i  
aktivnost efluks crpke u gujavici *Eisenia andrei***

Diplomski rad

Osijek, 2019.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Diplomski rad

**Utjecaj fungicida Pyrus 400 SC na ponašanje, aktivnost enzima i aktivnost efluks crpke u gujavici *Eisenia andrei***

Marija Hmura

**Rad je izrađen:** Odjel za biologiju, Osijek**Mentor:** Dr. sc. Mirna Velki, docent**Kratak sažetak diplomskog rada:**

Fungicid Pyrus čija je glavna aktivna tvar pirimetanil, koncentracije 400 g/L, učinkovit je u suzbijanju sive plijesni, inhibira izlučivanje gljivičnih enzima, sprječava probavljanje biljnog tkiva i razvoj bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak fungicida Pyrus na gujavice vrste *Eisenia andrei*. Određene su subletalne koncentracije fungicida koje ne uzrokuju morfološke promjene ni ugibanje gujavica, te je proveden test izbjegavanja, mjerene su aktivnosti enzima i aktivnost efluks crpke. Testom izbjegavanja utvrđeno je da gujavice izbjegavaju tlo tretirano fungicidom na svim ispitivanim koncentracijama. Mjerenjem promjena u aktivnosti različitih enzima, AChE, CAT, GR, CES i GST, uočeno je smanjenje aktivnosti AChE na svim koncentracijama. Aktivnosti ostalih enzima nisu pokazali značajnu promjenu u odnosu na kontrolu. Mjerenjem koncentracije Rodamina B utvrđena je inhibicija efluks crpke na nižim koncentracijama, odnosno dulje zadržavanje Rodamina B. Na većim koncentracijama zabilježena je indukcija aktivnosti efluks crpke, odnosno povećano izbacivanje Rodamina B. Rezultati pokazuju da fungicid Pyrus 400 SC utječe na mjerene parametre u gujavicama te da izlaganje ovom fungicidu može imati negativne učinke na gujavice.

**Broj stranica:** 46**Broj slika:** 9**Broj tablica:** 2**Broj literaturnih navoda:** 128**Broj priloga:** 0**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** pirimetanil, *Eisenia andrei*, test izbjegavanja, aktivnost enzima, efluks crpka**Datum obrane:** 19.09.2019.**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Sandra Ečimović
2. Doc. dr. sc. Mirna Velki
3. Doc. dr. sc. Zorana Katanić

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology****Master thesis****Graduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**Effect of fungicide Pyrus 400 SC on behavior, enzyme activity and efflux pump activity in earthworm***Eisenia andrei***Marija Hmura****Thesis performed at:** Department of Biology, Osijek**Supervisor:** Mirna Velki, PhD, Assistant Professor**Short abstract:**

Fungicide Pyrus contains pyrimethanil as active ingredient, concentration of 400 g/L, effective is in suppressing gray mold, inhibits the secretion of fungal enzymes blocking the ability of fungi to degrade and digest the plant tissues and thus stopping development of the disease. The overall aim of this study was to evaluate the effects of fungicide Pyrus on earthworms *Eisenia andrei*. Sublethal concentrations of fungicide that do not cause morphological changes or death in earthworms were determined, the avoidance test was performed and enzyme activity and efflux pump activity were measured. Avoidance test indicated that earthworms avoid treated soil at all tested concentrations. Measuring changes in the activity of different enzymes, AChE, CAT, GR, CES and GST, a decrease in AChE activity was observed at all concentrations. No statistically significant difference in the activity of other enzymes was recorded between control and fungicide treatments. Measuring the concentrations of Rodamin B revealed the inhibition of the efflux pump activity at lower concentrations, respectively, longer retention of Rodamin B. At higher concentrations the induction of the efflux pump activity was observed, respectively, the elimination of Rodamin B was enhanced. The results showed that the fungicide Pyrus 400 SC affects the measured parameters in earthworms and that exposure to this fungicide could have a harmful effects on earthworms.

**Number of pages:** 46**Number of figures:** 9**Number of tables:** 2**Number of references:** 128**Original in:** Croatian**Keywords:** pyrimethanil, *Eisenia andrei*, avoidance test, enzyme activity, efflux pump**Date of the thesis defence:** 19.09.2019.**Reviewers:**

1. Doc. dr. sc. Sandra Ečimović
2. Doc. dr. sc. Mirna Velki
3. Doc. dr. sc. Zorana Katanić

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirni Velki na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima, strpljenju i presenenom znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, bratu i dečku na pruženoj potpori, ljubavi i razumijevanju tijekom studiranja.*

*Hvala mojim dragim prijateljima po kojima ću pamtiti studentsko razdoblje i s kojima je studiranje bilo lakše.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Pesticidi u tlu .....	1
1.2. Pyrus 400 SC .....	1
1.3. Pirimetanil .....	2
1.4. Biologija gujavica.....	4
1.5. Gujavice kao inženjeri ekosustava .....	6
1.6. Test izbjegavanja.....	7
1.7. Biomarkeri u toksikološkim istraživanjima.....	8
1.7.1. Biomarkeri neurotoksičnosti .....	9
1.7.2. Oksidativni stres .....	10
1.7.3. Biotransformacija ksenobiotika .....	10
1.8. Efluks crpka.....	12
1.9. Ciljevi istraživanja.....	13
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	14
2.1. Preliminarni test toksičnosti .....	14
2.2. Test izbjegavanja .....	14
2.3. Izlaganje gujavica u svrhu određivanja enzimske aktivnosti .....	15
2.3.1. Homogenizacija gujavica .....	15
2.3.2. Mjerenje proteina.....	16
2.3.3. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) .....	16
2.3.4. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	16
2.3.5. Određivanje aktivnosti karboksilesteraze (CES).....	16
2.3.6. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR).....	17
2.3.7. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST).....	17
2.4. Izlaganje gujavica u svrhu mjerenja aktivnosti efluks crpke.....	17
2.4.1. Određivanje aktivnosti efluks crpke .....	18
2.5. Statistička obrada podataka .....	18
<b>3. REZULTATI</b> .....	19
3.1. Preliminarni test toksičnosti .....	19
3.2. Test izbjegavanja.....	20
3.3. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE).....	22
3.4. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima katalaze (CAT).....	23
3.5. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima karboksilesteraze (CES).....	24
3.6. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima glutation reduktaze (GR).....	25

3.7. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST).....	26
3.8. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost efluks crpke kod gujavice <i>Eisenia andrei</i> .....	27
<b>4. RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>32</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>33</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Pesticidi u tlu

Osnovna potreba čovječanstva je osigurati dovoljne količine hrane. Proizvodnja hrane suočena je s brojnim izazovima, a jedan od glavnih izazova je brzorastuća populacija ljudi i smanjenje obradive zemlje (Walker i sur., 2001). Tlo je dinamičan i jedinstven sustav u prirodi, stanište je brojnim organizmima te zbog svog sastava zadržava korisne tvari, ali isto tako i štetne tvari poput pesticida (De Silva i sur., 2008).

Pesticidi su kemikalije koje odbijaju, reguliraju ili ubijaju štetne organizme. Postoji velik broj pesticida, a najčešće se prema namjeni dijele na: insekticide, koji služe za suzbijanje kukaca; herbicide, koji služe za suzbijanje trava i korova; fungicide, koji djeluju u suzbijanju gljivica (Huseth i sur., 2015). Međutim, osim pozitivnih učinaka pesticida u suzbijanju ciljnih organizama, odnosno štetočina, također imaju i negativne učinke, prvenstveno na kvalitetu tlu i neciljne organizme (Wang i sur., 2016).

Povećana potražnja hrane zahtijeva poboljšanje poljoprivrednih aktivnosti i optimizaciju proizvodnje kako bi se smanjile bolesti usjeva poput onih uzrokovanih gljivicama (Hirooka i Ishii, 2013). Fungicidi su tvari čija je svrha uništavanje ili kontroliranje gljivičnih infekcija. Brojni organski, ali i anorganski spojevi djeluju kao fungicidi u zaštiti poljoprivrednih vrsta i koriste se za sprječavanje ili suzbijanje gljivične infekcije biljaka (Caballero i sur., 2003). Fungicidi su treća najčešće korištena skupina kemikalija (Grube i sur., 2006). Široko su rasprostranjeni u agrikulturi u zaštiti voća i povrća, ukrasnih biljaka, drveća, usjeva i žitarica (Walker i sur., 2001). Često se koriste profilaktički, odnosno u svrhu sprječavanja oboljenja te se koriste nekoliko puta u sezoni ovisno o stanju i vrsti usjeva, čime se povećava rizik od kroničnog izlaganja neciljnih organizma (Reilly i sur., 2012).

## 1.2. Pyrus 400 SC

Pyrus 400 SC je preventivni i kurativni fungicid koji je učinkovit u suzbijanju sive plijesni u vinogradarstvu, cvjećarstvu, voćarstvu i povrtlarstvu. Otporan je na ispiranje kišom te je dozvoljen za amatersku upotrebu. Pyrus je jedini botriticid na tržištu s izraženim plinovitim djelovanjem (Web 2). Botriticidi su specifični fungicidi za suzbijanje vrste *Botrytis cinerea* (Ivančan, 2009). Za razliku od ostalih fungicida, Pyrus ima produljeno djelovanje na uzročnike bolesti putem plinovite faze. pH vrijednost fungicida je 7.3 (Web 1). U sastavu je glavna aktivna



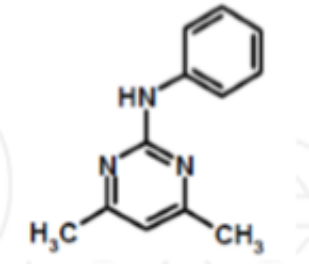
tvar pirimetanil, koncentracije 400 g/L (Web 2). Pirimetanil se koristi za suzbijanje sljedećih bolesti: *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Cercospora* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Monilia* spp., *Mycosphaerella* spp., *Penicillium* spp., *Venturia* spp (Web 1).

### 1.3. Pirimetanil

Pirimetanil (N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-anilin) pripada skupini anilinopirimidina (Fritz i sur., 1996). Anilinopirimidini su kemijska skupina fungicida vrlo učinkovita u borbi protiv širokog raspona gljivica te imaju nisku toksičnost (Gupta, 2014). Nisu genotoksični niti su karcinogeni (Waechter i sur., 2010).

Fungicidi, čija je glavna aktivna tvar pirimetanil, jedni su od najčešće korištenih u vinogradima Europe (Navarro i sur., 2000). Kemijske i toksikološke karakteristike pirimetanila prikazane su u Tablici 1. Pirimetanil inhibira izlučivanje gljivičnih enzima koji uzrokuju infekciju. Djeluje na način da brzo prodire u kutikulu i sprječava degradaciju i probavljanje biljnog tkiva te na taj način sprječava razvoj bolesti (EFSA Scientific Report 2006). Milling i Richardson (1995) dokazali su da pirimetanil inhibira izlučivanje ekstracelularnih enzima kod vrste *Botrytis cinerea* te je na koncentracijama pirimetanila na kojima ne dolazi do inhibicije rasta zabilježena smanjena aktivnost mjerenih enzima: poligalakturonaze, celulaze, proteinaze i lakaze. Pirimetanil nema sposobnost bioakumulacije, oralna apsorpcija je brza te brzo dolazi do njegove ekskrecije. Zabilježeno je da pirimetanil ima nisku akutnu toksičnost te da ne dovodi do iritacije oka i kože. Nema dostupnih podataka o mutagenom, genotoksičnom ili karcinogenom utjecaju pirimetanila. Također, pirimetanil nije teratogen, nema štetne učinke na reprodukciju i nije neurotoksičan (EFSA Scientific Report, 2006). Fungicidi iz skupine anilinopirimidina, uključujući pirimetamil, sprječavaju izlučivanje hidrolitičkih enzima gljivica poput proteaza, lipaza i enzima koji razgrađuju staničnu stijenku poput pektinaza, kutinaza i celulaza (Milling and Richardson, 1995). U tlu u tamnim aerobnim uvjetima zadržavanje pirimetanila je srednje do umjereno. Pirimetanil se ne smatra toksičnim kratkoročno niti dugoročno za ptice koje će boraviti u području tretiranom ovim fungicidom ili će konzumirati tretirano voće. Najveća je stopa rizika odmah nakon tretmana te se vremenom smanjuje. U konačnici, i za ptice i za sisavce, pirimetanil se smatra niskotoksičnim. Akutna toksičnost pirimetanila za gujavice smatra se niskom. Sadržaj pirimetanila u reprezentativnoj formulaciji je 400 g/L (čisti) (EFSA Scientific Report, 2006).

**Tablica 1.** Kemijske i toksikološke karakteristike pirimetanila (EFSA Scientific Report, 2006).

Naziv kemikalije (IUPAC)	N-(4, 6-dimetilpirimidin-2-il)-anilin	
Naziv kemikalije (CA)	4, 6-dimetil-N-fenil-2-pirimidinamin	
Molekularna formula	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	
Molekularna masa	199.28 g/mol	
Strukturalna formula		
Temperatura raspada	189.54 - 344.74 °C	
Zapaljivost	Nije zapaljivo	
Eksplozivna svojstva	Nije eksplozivno	
Iritacija kože	Nije iritirajuće	
Iritacija oka	Nije iritirajuće	
Genotoksičnost	Nema podataka	
Vrijeme degradacije u vodi	VD <sub>50</sub> voda	9 - 24 dana
	VD <sub>90</sub> voda	70 - 99 dana
	VD <sub>50</sub> ekosustav	40 - 121 dan
	VD <sub>90</sub> ekosustav	134 dana
Toksičnost za vodene organizme	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LC <sub>50</sub> (96 h): 10.56 mg/L
	<i>Daphnia</i> sp.	EC <sub>50</sub> (96 h): 2.9 mg/L
	<i>Daphnia magna</i>	NOEC (21 d): 0.94 mg/L
	<i>Chironomus riparius</i>	NOEC (28 d): 4.0 mg/L

## 1.4. Biologija gujavica

Gujavice pripadaju koljenu Annelida, razredu Clitellata i podrazredu Oligochaeta (Kooch i Jalilvand, 2008). Tijelo gujavica je mekano te je izvana i iznutra jasno kolutićavo. Na prednjem dijelu tijela nalazi se prostomij ili akron. Akron se ne smatra kolutićem, već izbočinom jer u njemu ne postoji celom (Habdija i sur., 2004). Tijelo gujavica je izduženo, cilindrično i mekano (Kooch i Jalilvand, 2008). Obavijeno je jednoslojnom epidermom koja je pokrivena albuminoznom kutikulom koja je vrlo tanka, ali otporna. Epiderma je opskrbljena žljezdanim stanicama, a ispod epiderme nalaze se prstenasti, uzdužni i kosi mišići. Celom je tjelesna šupljina koja ima kolutićav raspored. Svakom kolutiću odgovara lijeva i desna celomska vrećica ispunjena tekućinom koja ima funkciju hidroskeleta i služi kao oslonac prstenastim i uzdužnim mišićima tijekom kretanja. Redovi više ili manje uočljivih četina na tijelu nalaze se postrance i trbušno (Habdija i sur., 2004). Na svakom segmentu nalazi se četiri para četina koje osiguravaju kretanje (Kooch i Jalilvand, 2008). Živčani sustav je ljestvičast. U svakom kolutiću na trbušnoj strani nalazi se po jedan par živčanih ganglija koji su međusobno povezani konektivama tako da imaju ljestvičast raspored (Habdija i sur., 2004). Gujavice izlučuju sekret koji osigurava konstantnu vlagu tijela. Iako nemaju posebne organe za vid, sluh ili olfaktorne organe, imaju specifične senzorne stanice duž tijela (Gajalakshmi i Abbasi, 2004). Gujavice su životinje bilateralne simetrije (Kooch i Jalilvand, 2008). Hermafroditi su, odnosno imaju i muške i ženske gonade. Jaja polažu u kokone i nemaju stadij ličinke. Razlika između mladih i odraslih gujavica je pojava pojasa ili kliteluma (eng. *clitellum*) u odraslih jedinki. Klitelum je zadebljala epiderma koja se nalazi ispod anteriornih kolutića (Gajalakshmi i Abbasi, 2004). Gujavice se najčešće hrane raspadnutom organskom tvari u tlu, ali i lišćem ili drugim biljnim materijalom na površini (Kooch i Jalilvand, 2008). Nalazimo ih u svim dijelovima svijeta, a izuzetak su pustinje, područja vječnog snijega i leda, planine te područja bez tla i vegetacije (Gajalakshmi i Abbasi, 2004).

Smatra se da su gujavice evoluirale prije 570 milijuna godina (Sathe, 2004). Kooch i Jalilvand (2008) navode podatak da postoji ukupno 3627 vrsta gujavica u svijetu. Bouche (1977) je gujavice klasificirao u 3 kategorije s obzirom na ekološku distribuciju u tlu (Slika 1):

### A) Epigejne gujavice:

Karakterizira ih mala veličina, tamno obojenje, vrlo dobra pokretljivost i otpornost na promjene temperature. Nalazimo ih ispod biljnih ostataka i iznad mineralnog sloja tla. Nemaju značajnu ulogu u stvaranju humusa, ali imaju važnu ulogu u

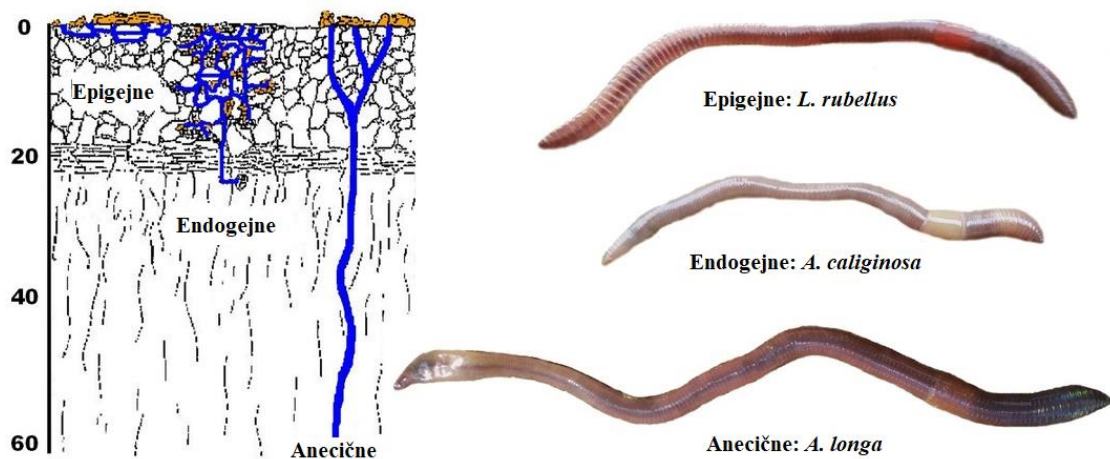
vermikompostiranju. S obzirom da se nalaze blizu površine tla, nemaju važnu ulogu u kopanju tunela i stvaranju makropora. Predstavnici epigejnih gujavica su: *Eisenia fetida*, *Dendrobaena rubida*, *Perionyx excavatus* i *Eudrilus eugeniae*.

#### B) Anecične gujavice:

Karakterizira ih pigmentiranost samo na prednjem i stražnjem dijelu tijela. Velike su i većinom su fitofagi. Imaju važnu ulogu u miješanju nutrijenata iz dubljih slojeva tla s površinskim slojem. Nalazimo ih u mineralnom sloju tla do 3 m dubine i kopaju dugačke, vertikalne tunele u tlu. Glavni predstavnici su: *Lampito mauritii*, *Aporrectodea longa* i *Lumbricus terrestris*.

#### C) Endogejne gujavice:

Karakterizira ih slaba pigmentacija, a mogu biti velike ili male veličine. Nalazimo ih u mineralnom i organskom sloju tla, najčešće na dubini 10-15 cm. Tuneli nisu vertikalno orijentirani, nisu dugački i nemaju velik promjer poput tunela koje kopaju anecične gujavice. Predstavnici endogejnih gujavica su: *Metaphire posthuma*, *Octochaetona thurstoni*, *Allolobophora caliginosa*, *Aporrectodea rosea* i *Octolaseon cynaeum*.



**Slika 1.** Prikaz 3 kategorije gujavica s obzirom na ekološku distribuciju u tlu.

(Izvor: Web 3)

Lee (1985) je klasificirao gujavice u 2 kategorije s obzirom na način hranjenja:

A) Detritivorne gujavice:

Hrane se biljnim ostacima, mrtvim korijenjem ili otpadom sisavaca na površini tla ili blizu površine. Predstavnici su: *Eisenia fetida*, *Lampito mauritii*, *Perionyx excavatus* i *Eudrilus eugeniae*.

B) Geofagne gujavice:

Hrane se u dubljim slojevima tla, a probavljaju tlo bogato organskom tvari. Predstavnici su: *M. posthuma* i *Octochaetona thurstoni*.

### 1.5. Gujavice kao inženjeri ekosustava

Inženjeri ekosustava su organizmi koji direktno ili indirektno mijenjaju dostupnost resursa za sebe, ali i za druge vrste (Jones i sur., 1994). Zbog svojih aktivnosti i utjecaja na ekosustav tla, gujavice se smatraju inženjerima ekosustava (Jones i sur., 1994). Gujavice su detritivorni organizmi koji povećavaju biorasploživost nutrijenata za biljke (Rorat i Vandenbulcke, 2019), te utječu na dinamiku organske tvari i mikrobiološku zajednicu (Edwards i Bohlen, 1996). Uz pomoć mutualističkog odnosa s mikroflorom tla, probavljaju i pretvaraju nisko kvalitetnu organsku tvar u produkte bogate nutrijentima (Singh i sur., 2014). U probavilu sadrže brojne endogene i egzogene enzime pomoću kojih se organski minerali prevode u spojeve lako dostupne biljkama (Suthar, 2012).

Gujavice zauzimaju 60-80% ukupne životinjske biomase u tlu (Wang i sur., 2016), te aktivno sudjeluju u aeraciji i bioturbaciji tla, odnosno miješanju slojeva tla (Rorat i Vandenbulcke, 2019). Načinom života pozitivno utječu na strukturu i pedogenezu tla (Blouin i sur., 2013), a kopanjem tunela utječu na mehanička i hidraulička svojstva tla. Tuneli pod utjecajem kiše, navodnjavanja i gravitacije provode različite tvari. Također, stvaraju makropore koje značajno utječu na infiltraciju vode i stoga su važni za opskrbu usjeva vodom i u kontroli erozije tla (Le Bayon i sur., 2002). Svojom brojnošću i zastupljenošću pojedinih vrsta u određenom dijelu tla, ponašanjem jedinki u doticaju sa supstratom (izbjegavanjem ili preferiranjem tla) te akumulacijom kemikalija iz tla u tijelu daju informacije o kvaliteti tla (Fründ i sur., 2011).

Mnoge vrste gujavica lako se prikupljaju, a neke se i lako uzgajaju (Lowe i Butt 2005; Yasmin and D'Souza, 2007). S obzirom da gujavice nemaju debelu kutikulu poput ostalih

organizama u tlu, vrlo su osjetljive na štetne tvari (Liu i sur., 2018) pa predstavljaju važne biondikatore onečišćenja tla (OECD, 1984). Također, međunarodna zajednica ih je odredila kao glavne vrste za proučavanje okolišnih utjecaja antropogenih zagađivala kao što su pesticidi, ugljikovodici i metali (Edwards i Bohlen, 1996). Učinak pesticida na gujavice ovisi o tipu i stopi aplikacije pesticida, vrsti i starosti gujavica te o okolišnim uvjetima. Gujavice koje se nalaze iznad mineralnog sloja tla ili blizu površine više su izložene djelovanju pesticida, za razliku od gujavica u dubljim slojevima tla (Singh, 2018). Većina toksikanata koje gujavice unesu ili apsorbiraju, akumuliraju se u organizmu te se prenose kroz hranidbeni lanac (Chevillot i sur., 2017). Budući da su gujavice važan dio hranidbenog lanca jer predstavljaju važan izvor hrane za mnoge vrste (Rorat i Vandenbulcke, 2019), bioakumulacija različitih tvari može imati štetne posljedice na više skupine organizama koje se njima hrane (Šmídová i sur., 2015).

## **1.6. Test izbjegavanja**

Test izbjegavanja je subletalni test temeljen na promjeni ponašanja gujavica koje izbjegavaju tlo tretirano kemikalijama i odlaze u netretirani dio tla (Yearley i sur., 1996). Ovaj test se koristi za procjenu kvalitete tla i učinka zagađivala na ponašanje gujavica (ISO, 2005), a temelji se na prisutnosti kemoreceptora na prednjim segmentima i senzornih stanica na površini tijela gujavica pomoću kojih prepoznaju širok raspon zagađivala (Scheffczyk i sur., 2014). Prepoznavanje štetnih tvari omogućava izbjegavanje kontaminiranog tla i dokazuje da gujavice pomoću kemoreceptora osjećaju prisutnost zagađivala (Reinecke i sur., 2002). Yearley i sur. (1996) navode da u većini slučajeva test izbjegavanja može biti osjetljiviji, ali i bolji indikator zagađenja koji daje brže rezultate od akutnog testa toksičnosti. Osjetljivost testa izbjegavanja može se usporediti sa osjetljivošću testa reprodukcije (Hund-Rinke i sur., 2003). Specifičnost je mala što znači da će gujavice reagirati na širok raspon zagađivala te ima ekološku važnost, što znači da učinak na jedinku može imati posljedice na višim biološkim razinama (Pelosi i sur., 2013). Izbjegavanje kontaminiranog tla dovodi do emigracije gujavica što može imati ozbiljne posljedice na kvalitetu tla budući da su gujavice vrlo važni kao inženjeri ekosustava u održavanju kvalitete tla (Reinecke i sur., 2002). Na taj problem ukazali su Mather i Christensen (1998). Ustanovili su da izbjegavanje kontaminiranog tla zbog osjeta toksikanta može dovesti do promjena u gustoći populacije, biomasi i raznolikosti vrsta što se odražava na zajednice gujavica. Edwards i Coulson (1992) također navode da promjena ponašanja gujavica pruža informacije o kvaliteti tla. U urbanim i poljoprivrednim područjima tlo sadržava različita zagađivala koji utječu na organizme tla (Van Gestel i Van Brummelen, 1996).

Test izbjegavanja prikladan je za testiranje učinka pesticida zbog kratkog vremenskog perioda provođenja eksperimenta i financijske isplativosti (De Silva i sur., 2009). Brojne su prednosti testova ponašanja u usporedbi s drugim subletalnim testovima poput testa rasta i reprodukcije te akutnog testa toksičnosti (Hund-Rinke et al., 2003). Potreban je manji vremenski period prilikom provođenja testa izbjegavanja (2 dana) u usporedbi s testom reprodukcije (56 dana) i akutnim testom toksičnosti (14 dana) (OECD, 1984; ISO, 2008). Test je prikladan za brzo provjeravanje velikih površina zagađenog tla ili velikog broja uzoraka tla (Gao i sur., 2016). Financijski je isplativ, ne zahtijeva puno vremena za provođenje eksperimenta te je sam postupak relativno jednostavan (Yearley i sur., 1996). Jedan od argumenata protiv upotrebe ovog testa je da je to test odbojnosti, a ne test toksičnosti (Capowiez i sur., 2003).

S obzirom na građu tijela i način života, gujavice nemaju kompleksno ponašanje za razliku od sisavaca, ptica ili kukaca. Međutim i njihovo ponašanje je dovoljno relevantno kako bi se utvrdio njihov utjecaj na funkcije tla. Štoviše, s obzirom da se gujavice smatraju inženjerima ekosustava, promjene njihova ponašanja imaju važne posljedice na tlo (Pelosi i sur., 2013). Različite kemikalije, uključujući pesticide, koje se nalaze u tlu mogu utjecati na promjenu ponašanja gujavica (Tomlin, 1992). Smatra se da ponašanje izbjegavanja uzrokuje promjena kvalitete staništa tla, kao na primjer promjena kemijskog sastava tla. Izbjegavanje tretiranog tla ukazuje da gujavice imaju sposobnost osjeta toksičnih tvari i bijeg od istih (Pelosi i sur., 2013).

## **1.7. Biomarkeri u toksikološkim istraživanjima**

Biomarkeri se definiraju kao bilo koji biološki odgovor jedinke na kemikalije u okolišu (Walker i sur., 2001). Indikatori su biološkog stanja i daju informaciju o izloženosti organizma ksenobioticima, o učinku izlaganja na organizam ili o otpornosti organizma na ksenobiotike (Gupta, 2014). Biološki markeri su biokemijska, fiziološka, histološka, morfološka i bihevioralna mjerenja u uzorcima tkiva ili tjelesnoj tekućini (Walker i sur., 2001). Prikazuju učinak različitih stresora iz okoliša na sve razine biološke organizacije, od stanice do ekosustava. Najčešće prikazuju subletalne biokemijske promjene koje nastaju kao posljedica izloženosti ksenobioticima (Lagadic i sur., 1994). Biološki markeri su indikatori narušavanja homeostaze unutar organizma (organa, tkiva, stanice, organela) što posljedično dovodi do razvoja bolesti kao odgovor na izloženost ksenobioticima (Ward i Henderson, 1996).

Biomarkeri se primjenjuju u svim područjima toksikologije, a najčešće za ispitivanje toksičnosti pesticida, mikotoksina, metala i lijekova (Gupta, 2014). U toksikološkim istraživanjima biomarkeri moraju biti kvantitativni, osjetljivi, specifični, neinvazivni i lako mjerljivi kako bi bili koristan alat za ispitivanje toksičnosti (Timbrell, 1998). Velik broj biokemijskih promjena djeluju kao indikatori biološkog odgovora, a promjene u aktivnosti enzima djeluju kao unutarnji markeri izloženosti herbicidima i fungicidima (Gupta, 2014).

### **1.7.1. Biomarkeri neurotoksičnosti**

Biomarkeri neurotoksičnosti su indikatori promjena ili oštećenja u živčanom sustavu, a jedan od biomarkera neurotoksičnosti je promjena u enzimskoj aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) (Gupta, 2014). Uloga AChE je razgradnja neurotransmitera acetilkolina (ACh) (Lockridge i Schopfer, 2006). Kada je enzim blokiran više ne može sudjelovati u hidrolizi ACh, stoga se neurotransmitter akumulira i ima štetno djelovanje na središnji i periferni živčani sustav (Lotti, 1995). ACh se akumulira na završecima kolinergičkih živaca post-sinaptičke membrane i uzrokuje pretjeranu stimulaciju električne aktivnosti i oštećenja živčanog sustava (Walker i sur., 2001).

Promjena u enzimskoj aktivnosti AChE koristi se kao biomarker za izloženost organofosfatnim i karbamatnim pesticidima (Gupta, 2014). Organofosfati i karbamati inhibiraju aktivnost AChE na način da prvo stvaraju kompleks sa enzimom. Zatim ga fosforiliraju i potom slijedi korak defosforilacije. Suvišak acetilkolina blokira prijenos kroz sinapse održavajući receptore acetilkolina u otvorenoj (ionskoj) konfiguraciji (O'Brien, 1976). Posljedično je oslabljen prijenos neuromišićnog signala (Georgiadis i sur., 2018). Organofosfati i karbamati često dovode do smrti organizama, a krajnji uzrok smrti najčešće je asfiksija, odnosno gušenje i prestanak disanja.

Osim organofosfata i karbamata, poznato je da inhibiciju AChE mogu uzrokovati i druge skupine kemikalija. Istraživanjem koje su proveli Payne i sur. (1996) utvrđena je inhibicija AChE za čak 50 % u ribama, a smatra se da je to posljedica djelovanja različitih zagađivala u vodi. Guilhermino i sur. (1998) utvrdili su da metali i deterdženti također inhibiraju aktivnost ovog enzima.



### 1.7.2. Oksidativni stres

Slobodni radikali kisika i dušika esencijalni su za funkciju stanica te se kontinuirano proizvode u stanicama (Halliwell i Gutteridge, 1999). Neravnoteža između stvaranja i neutralizacije reaktivnih kisikovih jedinica uzrokuje oksidativni stres (Davies, 1995). ROS (eng. *reactive oxygen species*) je naziv za kemijske spojeve koji se formiraju uslijed nekompletne redukcije kisika, a uključuje: vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), superoksidni anion ( $O_2^-$ ) i hidroksilni radikal ( $HO^*$ ) (D'Autréaux i Toledano, 2007). ROS su produkt transportnog lanca elektrona, enzima i redoks ciklusa, ali njihova proizvodnja može biti potaknuta djelovanjem ksenobiotika (Winston i Giulio, 1991). Pesticidi mogu uzrokovati oksidativni stres dovodeći do stvaranja reaktivnih kisikovih jedinica (Oruc, 2010).

Tijekom evolucije organizmi su razvili enzimске i ne enzimске antioksidativne mehanizme za zaštitu staničnih komponenti od oksidativnih oštećenja (Davies, 1995). Antioksidativni enzimi koji sudjeluju u zaštiti organizma od oksidativnog stresa na način da uklanjaju ROS su: superoksid dismutaza (SOD), glutacion peroksidaza (GPX), glutacion reduktaza (GR) i katalaza (CAT) (Livingstone, 2001).

CAT ima ulogu razgradnje  $H_2O_2$  na vodu i  $O_2$  (Lackner, 1998). CAT se primarno nalazi u peroksisomima, vjerojatno zbog velikog broja oksidaza koje proizvode  $H_2O_2$ , ali se također nalazi i u citosolu i mitohondriju (Quinlan i sur., 1994). Enzimi metabolizma glutaciona su sekundarni enzimi uključeni u antioksidativnu obranu. Glutacion-S-transferaza (GST) katalizira konjugaciju reduciranog glutaciona (GSH) s nukleofilnim ksenobioticima ili staničnim komponentama oštećenima djelovanjem ROS, što dovodi do njihove detoksikacije. NADPH-ovisna glutacion reduktaza (GR) obnavlja GSH supstrat za GPX i GST iz oksidiranog glutaciona (GSSG) (Storey, 1996). GST ima dvije važne uloge: sudjeluje u detoksikaciji ROS i osigurava antioksidativnu obranu od oksidativnog stresa uzrokovanog ksenobioticima (Frova, 2006; Blanchette i sur., 2007).

### 1.7.3. Biotransformacija ksenobiotika

Biotransformacija ksenobiotika je proces pretvorbe lipofilnih tvari u hidrofilne koje se potom izlučuju iz tijela putem urina ili žuči (Parkinson, 2008). Većina stranih tvari u tijelu su lipofilne, topljive u mastima. Za razliku od hidrofilnih tvari koje su topljive u vodi, lipofilne tvari su nepolarne i stoga su vrlo slabo topljive u vodi. Lipofilne tvari moraju se pomoću

detoksikacijskih mehanizama pretvoriti u tvari topljive u vodi prije nego što dođe do njihove ekskrecije iz organizma (Chen, 2011).

Proces biotransformacije kataliziran je različitim enzimima (Parkinson, 2008). Postojanje dvije faze metabolizma ksenobiotika prvi je predložio Williams (1959). Reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize pripadaju fazi I (Hodgson, 2010). U fazi I uvodi se nova funkcionalna skupina (npr.  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$ , ili  $-COOH$ ) (Ioannides, 2002). Reakcije faze I najznačajnije su za lipofilne ksenobiotike koji se ne mogu učinkovito izlučiti iz organizma ukoliko ne prođu proces metaboličke modifikacije (Hollingworth i sur., 1995). U fazi II dolazi do reakcije konjugacije (Hodgson, 2010). Reakcijom konjugacije nastaju konjugati topljivi u vodi spajanjem hidrofilnih spojeva kao na primjer sulfata, vode ili glutaciona sa reaktivnim funkcionalnim skupinama uvedenima u fazi I (Hollingworth i sur., 1995). Reakcija konjugacije smanjuje reaktivnost i toksičnost toksikanta. Produkti nastali u fazi I i fazi II biontransformacije uz pomoć membranskih proteina prenose se izvan stanice (LeBlanc 2008). Hidrofilne strane tvari koje sadrže polarnu skupinu ne prolaze fazu I, već direktno sudjeluju u reakciji konjugacije. Što je neka tvar lipofilnija to je teža njezina ekskrecija iz organizma putem bubrega. Hidrofilne tvari izlučuju se putem urina (Chen, 2011). Metabolizam može dovesti do stvaranja metabolita koji će biti više lipofilan od početne tvari (Ioannides, 2002).

Procesom biotransformacije mogu se promijeniti biološka svojstva ksenobiotika. Ksenobiotik može postati manje toksičan (detoksikacija), ali u nekim slučajevima može postati jače toksičan (aktivacija). Primjer aktivacije ksenobiotika je oksidacija etanola do acetaldehida, a oksidacija acetaldehida do octene kiseline je primjer detoksikacije (Parkinson, 2008).

Uz pomoć enzima koji kataliziraju pretvorbu lipofilnih u hidrofilne metabolite, dolazi do uklanjanja ksenobiotika iz organizma (Chen, 2011). Karboksilesteraza (CES) je uključena u fazu I metabolizma, a enzim glutation-S-transferaza (GST) pripada skupini II faze metabolizma (Hayes i sur., 2005). CES pripada hidrolitičkim enzimima (hidrolaze) i nalazi se u endoplazmatskom retikulumu i u citosolu stanica. Uključena je u metaboličku aktivaciju različitih ksenobiotika. Katalizira reakciju hidrolize karboksilnih estera i dolazi do stvaranja alkohola i karboksilne kiseline (Chen, 2011). GST je detoksikacijski enzim koji katalizira konjugaciju reduciranog glutaciona (GSH) s nepolarnim tvarima koje sadrže elektrofilni ugljik, dušik ili sumpor. Uključena je u konjugaciju i ekskreciju ksenobiotika (Lackner, 1998). Neutralizira širok raspon ksenobiotika i endogenih produkata metabolizma te sudjeluju u detoksikaciji pesticida. GST katalizira reakciju konjugacije te dolazi do inaktivacije reaktivnih metabolita ili međuprodukta čime se pospješuje njihova ekskrecija iz tijela (Hayes i sur., 2005).

## 1.8. Efluks crpka

Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti je stanični detoksikacijski mehanizam koji osigurava prvu liniju obrane organizma, a posredovan je aktivnostima ATP-vezujućih kazeta (eng. *ATP-binding cassette*) (ABC) transportera (Luckenbach i sur., 2014). Transportni proteini čine efluks crpku te su uključeni u izbacivanje supstrata iz unutrašnjosti stanice u vanjski okoliš. Mogu biti specifični za određeni supstrat ili mogu prenositi veći broj strukturno različitih tvari, a nalaze se u citoplazmatskoj membrani. Efluks proteini kataliziraju izbacivanje štetnih tvari iz stanice što je jedna od najčešćih strategija otpornosti na ksenobiotike i citotoksične tvari u prokariota i eukariota (Borges-Walmsley i Walmsley, 2001; Saier i Paulsen, 2001).

Postojanje efluks crpke zabilježeno je kod prokariota i eukariota (Bambeke i sur., 2003). Kod prokariota efluks štetnih tvari povezan je s inluksom protona ( $H^+$ ) te na taj način dolazi do izbacivanja tvari iz organizma (Saier i sur., 1999; Pao i sur., 1998; Ward i sur., 2001). U istraživanjima su najviše proučavani efluks transportni proteini ATP-vezujuće kazete (ABC) transporteri (Bošnjak i sur., 2014). P-glikoprotein pripada superobitelji (ABC) transportera ATP-vezujuće kazete i prenosi štetne tvari izvan stanice, a energiju za transport dobiva od hidrolize ATP-a (Higgins, 1992). P-glikoprotein sprječava akumulaciju fosfolipida, endogenih metabolita i ksenobiotika u izloženom organizmu na način da prenosi različite spojeve. Spojevi su najčešće umjereno hidrofobni, prirodni produkti koji su često i supstrati ili metaboliti detoksikacijskih enzima poput citokroma P450 (Bard, 2000). P-glikoprotein prenosi iz stanice različite zagađivače, uključujući pesticide, lijekove i ostale ksenobiotike, zbog čega dolazi do različite toksičnosti tih tvari u organizmu (Bain i LeBlanc, 1996). Verapamil (VER) je jedan od prvih otkrivenih inhibitora efluksa lijekova posredovanih P-glikoproteinom (Tsuruo i sur., 1981).

Prisutnost ksenobiotika inducira mehanizam multiksenobiotičke otpornosti, a s obzirom da je prisutna u više taksonomskih skupina, smatra se prvom linijom obrane organizma te se može koristiti kao biomarker izloženosti organizma onečišćenju (Epel, 1998). Prve dokaze o postojanju efluks crpke u gujavicama vrste *E. andrei* objavili su Hackenberger i sur. (2012). Bošnjak i sur. (2014) proveli su molekularne analize i odredili gensku ekspresiju P-glikoproteina (P-gp/ABCB1) u vrsti *E. fetida*. Dokazano je da različite tvari mogu uzrokovati promjenu u aktivnosti efluks crpke u gujavica. Tako je promjena u aktivnost efluks crpke zabilježena nakon izlaganja insekticidima dimetoatu (Velki i Hackenberger, 2013a), pirimifosmetilu i deltametrinu (Velki i Hackenberger, 2013b), herbicidima diuronu i fluazifop-p-butilu (Lackmann i sur., 2018), te fungicidu Pyrus 400 SC (Velki i sur., 2019).

## 1.9. Ciljevi istraživanja

Pyrus 400 SC, fungicid koji sadržava aktivnu tvar pirimetanil, učinkovit je u suzbijanju sive plijesni. Fungicidi s aktivnom tvari pirimetanilom jedni su od najčešće korištenih u vinogradima Europe. Učinak fungicida pirimetanila na gujavice do sada je slabo istražen. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja utvrditi djelovanje fungicida Pyrus 400 SC na gujavice provodeći test izbjegavanja, mjerenjem aktivnosti enzima i efluks crpke.

### Ciljevi istraživanja:

- Odrediti subletalne koncentracije fungicida Pyrus 400 SC koje ne uzrokuju pojavu smrtnosti niti morfološke promjene na gujavicama vrste *Eisenia andrei*.
- Pomoću testa izbjegavanja utvrditi utjecaj fungicida na ponašanje gujavica vrste *Eisenia andrei*.
- Utvrditi utjecaj fungicida na aktivnost enzima: AChE, CAT, CES, GR i GST.
- Utvrditi utjecaj fungicida na aktivnost efluks crpke kod gujavica vrste *Eisenia andrei*.

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Preliminarni test toksičnosti**

Dan prije početka eksperimenta gujavice su izvađene iz posude sa tлом i stavljene na vlažan filter papir u Petrijevu zdjelicu radi čišćenja probavila od zemlje. Birane su odrasle jedinke s jasno vidljivim klitelumom. Petrijeva zdjelica obložena je aluminijskom folijom te su načinjeni manji otvori na foliji radi dotoka zraka. Gujavice su ostavljene na čišćenju 24 h na sobnoj temperaturi. Potom su pripremljene kutije sa po 300 g tla (Lufa 2.2) za izlaganje gujavica te su priređene različite koncentracije fungicida Pyrus (400 SC, aktivna tvar: pirimetanil 400 g/L). U kutije sa 300 g tla apliciran je volumen fungicida od 30 mL, a u kontrolnu kutiju dodano je 30 mL vode. Tlo je dobro izmiješano radi homogene raspodjele fungicida te je stavljeno 10 gujavica u svaku kutiju. Sve koncentracije su priređene u duplikatu. Kutije su potom stavljene u ormarić u tamu na 48 h. Nakon 48 h gujavice su pregledane i prebrojane kako bi se utvrdilo koje koncentracije fungicida imaju štetne učinke na gujavice. Koncentracije na kojima je uočeno da gujavice imaju spazmove i nalaze se na površini zemlje ili su uginule, nisu korištene dalje u eksperimentu. Eksperiment je ponovljen nekoliko puta s različitim koncentracijama fungicida dok nisu utvrđene subletalne koncentracije kod kojih nisu bile vidljive morfološke promjene na gujavicama.

### **2.2. Test izbjegavanja**

Dan prije početka provođenja testa izbjegavanja, odrasle gujavice su izvađene i stavljene na vlažan filter papir u Petrijevu zdjelicu radi čišćenja probavila tijekom 24 h. Priređena su razrjeđenja pesticida s destiliranom vodom te su dodavanjem 30 mL ovih razrjeđenja pesticida u kutije s 300 g tla dobivene odabrane koncentracije pesticida: 10, 50 i 100 mg/kg. U kontrolnu kutiju s 300 g tla dodana je voda. Tlo je izmiješano kako bi se dobila homogena smjesa te je kutija pregrađena na dva dijela. Na jednu stranu dodano je kontrolno tlo, a na drugu stranu tlo tretirano fungicidom. Potom je pregrada uklonjena, a na granicu između kontrolnog i tretiranog tla stavljeno je 10 gujavica (Slika 2). Kutije su pohranjene u ormarić u tamu na 48 h. Sve koncentracije, kao i kontrola, priređene su u triplikatu. Gujavice su prebrojane 48 h nakon izlaganja fungicidu te je zabilježen broj gujavica koje se nalaze u kontrolnom i tretiranom tlu. Eksperiment je ponovljen tri puta. Odgovor izbjegavanja (%) izračunat je prema navedenoj jednadžbi (De Silva and Amarasinghe, 2008):

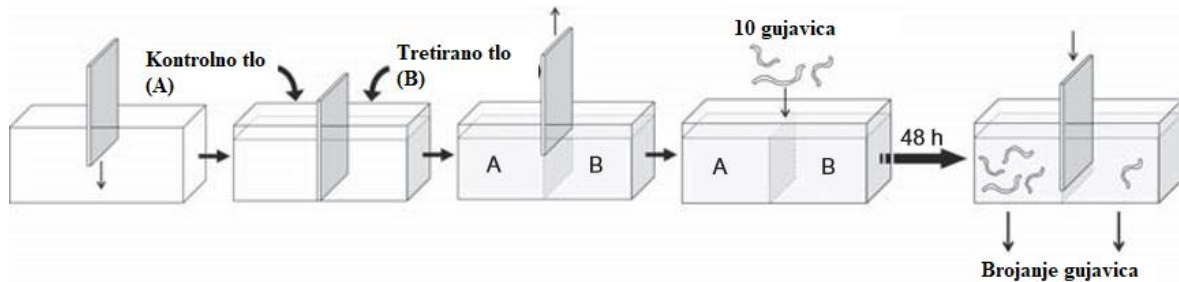
$$A = [(C-T)/N] \times 100$$

A = odgovor izbjegavanja (%)

C = broj gujavica u kontrolnom tlu

T = broj gujavica u tretiranom tlu

N = ukupan broj gujavica



**Slika 2.** Shema testa izbjegavanja

(Preuzeto i prilagođeno prema: Bécaert i Deschênes, 2006)

### 2.3. Izlaganje gujavica u svrhu određivanja enzimske aktivnosti

Na temelju rezultata testa izbjegavanja, određene su koncentracije za izlaganje gujavica fungicidu u svrhu mjerenja biomarkera. Odabrane su četiri koncentracije: 1, 10, 50 i 100 mg/kg, koje su bile subletalne (nisu uzrokovale smrtnost) i nisu uzrokovale morfološke promjene na gujavicama. Dan prije početka eksperimenta odrasle gujavice stavljene su na vlažan filter papir u Petrijevu zdjelicu koja je obložena aluminijskom folijom, radi čišćenja probavila od zemlje. U kutije sa po 300 g tla apliciran je volumen od 30 mL fungicida, a u kontrolnu kutiju s tлом dodano je 30 mL vode. Tlo je potom izmiješano radi dobivanja homogene smjese i dodano je 10 gujavica. Kutije su pohranjene u ormarić u tamu na 48 h, 7 i 14 dana.

#### 2.3.1. Homogenizacija gujavica

Gujavice su izvađene iz tla 48 h, 7 i 14 dana nakon izlaganja fungicidu. Svaka gujavica vagana je zasebno te je dodan fosfatni pufer (0.1 M, pH 7.2) u omjeru 1:3. Gujavice su homogenizirane pomoću homogenizatora. Uzorci su potom centrifugirani 30 min na 9000 g na 4 °C, a dobiveni supernatanti alikvotirani su u tri epice i korišteni za određivanje aktivnosti enzima.

### 2.3.2. Mjerenje proteina

Za određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorku korišten je Pierce BCA Protein Assay Kit. Uzorci su nanoseni na mikropločice i očitani uređajem Tecan reader. Na mikropločicu je dodano 23.5  $\mu\text{L}$  pufera (fosfatni pufer, 0.1 M, pH 7.2), 200  $\mu\text{L}$  radne otopine i 1.5  $\mu\text{L}$  uzorka. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi tokom 2 h mjerena je apsorbance na 562 nm. Ukupna koncentracija proteina u uzorku određena je pomoću jednadžbe pravca iz standardne krivulje koja je dobivena pomoću goveđeg serumskog albumina (BSA) te su rezultati izraženi u mg/ml.

### 2.3.3. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE)

Za određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE) korištena je metoda koju su opisali Ellman i sur. (1961). Na mikropločicu dodano je redom: 200  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 10  $\mu\text{L}$  DTNB, 7.5  $\mu\text{L}$  uzorka i 10  $\mu\text{L}$  acetiltiokolin jodida. Nakon dodavanja acetiltiokolin jodida započela je enzimski reakcija, a porast apsorbance mjereno je na 412 nm na uređaju Tecan reader kroz 2 min svakih 15 s. Specifična enzimski aktivnost AChE izražena je kao nmol u minuti po mg proteina ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PROT}$ ).

### 2.3.4. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Za određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT) korištena je metoda koju je opisao Claiborne (1985). U UV kivetu dodano je 500  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 15  $\mu\text{L}$  uzorka i 500  $\mu\text{L}$  vodikova peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Apsorbance je mjerena na 240 nm kroz 1 min svakih 15 s. U ovoj reakciji dolazi do razgradnje vodikova peroksida na vodu i kisik što posljedično dovodi do smanjenja apsorbance. Aktivnost CAT izražena je kao  $\mu\text{mol}$  vodikova peroksida razgrađenog u minuti po mg proteina ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PROT}$ ).

### 2.3.5. Određivanje aktivnosti karboksilesteraze (CES)

Kako bi se odredila aktivnost enzima karboksilesteraze (CES) korištena je spektrofotometrijska metoda koju su opisali Hosokawa i Satoh (2001). Metoda se temelji na određivanju aktivnosti CES upotrebom p-nitrofenil acetata. Na mikropločicu je dodano 10  $\mu\text{L}$  uzorka i 190  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil acetata. CES katalizira hidrolizu estera i tioestera ili amidnih grupa

karboksilnih kiselina. Otpuštanje fenola iz p-nitrofenil estera mjereno je na 405 nm kroz 2 min svakih 15 s. Specifična enzimsko aktivnost CES izražena je kao nmol proizvedenog nitrofenola u minuti po mg proteina ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PROT}$ ).

### **2.3.6. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)**

Habig i Jakoby (1981) opisali su metodu određivanja aktivnosti enzima glutation reduktaze (GR). Metoda se temelji na oksidaciji NADPH, dolazi do njegova smanjenja i posljedično do smanjenja apsorbance. Glutation reduktaza katalizira redukciju glutation disulfida (GSSG) na sulfhidrilni oblik glutationa (GSH) koristeći NADPH kao reducirajući agens. Na mikropločicu dodano je redom: 10  $\mu\text{L}$  uzorka, 100  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 100  $\mu\text{L}$  GSSG i 10  $\mu\text{L}$  NADPH. Apsorbanca je mjerena na 340 nm kroz 3 min svakih 20 s. Specifična enzimsko aktivnost GR izražena je kao nmol po minuti po mg proteina ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PROT}$ ).

### **2.3.7. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)**

Metodu određivanja aktivnosti glutation-S-transferaze (GST) opisali su Habig i Jakoby (1981). GST posreduje reakciju CDNB sa GSH, dolazi do proizvodnje GS-DNB konjugata te do porasta apsorbance što je mjereno na 340 nm. Stopa povećanja apsorpcije proporcionalna je aktivnosti GST u uzorku. Na mikropločicu dodano je 7.5  $\mu\text{L}$  uzorka, 160  $\mu\text{L}$  CDNB i 40  $\mu\text{L}$  GSH. Apsorbanca je mjerena kroz 1 min svakih 15 s. Specifična enzimsko aktivnost GST izražena je kao nmol konjugata GSH po minuti po mg proteina ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PROT}$ ).

## **2.4. Izlaganje gujavica u svrhu mjerenja aktivnosti efluks crpke**

Za određivanje aktivnosti efluks crpke korištena je metoda koju su opisali Hackenberger i sur. (2012). Odabrane su slijedeće koncentracije fungicida: 1, 10, 50, 100 mg/kg, koje nisu uzrokovale smrtnost niti morfološke promjene na gujavicama. Dan prije početka eksperimenta gujavice s jasno vidljivim klitelumom stavljene su na vlažan filter papir u Petrijevu zdjelicu radi čišćenja probavila. Potom je Petrijeva zdjelica obložena aluminijskom folijom te su načinjene rupice za dotok zraka. Gujavice su ostavljene na sobnoj temperaturi 24 h. U kutije s 300 g tla dodano je 20 mL Rodamina B (1000 mM) i 20 mL razrjeđenja fungicida. U kontrolnu kutiju s 300 g tla dodano je 20 mL Rodamina B (1000 mM) i 20 mL vode. Tlo je izmiješano



radi dobivanja homogene smjese te je u svaku kutiju stavljeno 10 gujavica. Kutije su pohranjene u ormarić u tamu na 48 h.

#### **2.4.1. Određivanje aktivnosti efluks crpke**

Na mikropločicu je dodano 250  $\mu\text{L}$  pufera (fosfatni pufer, 0.1 M, pH 7.2) i 10  $\mu\text{L}$  uzorka. Kalibracijska krivulja izrađena je koristeći Rodamin B te je količina Rodamina B u uzorku izračunata iz kalibracijske krivulje i izražena u nmol/g. Najveća koncentracija Rodamina B za standardnu krivulju je 25 mM te je razrijeđena 10 puta u omjeru 1:2. Mjerena je fluorescencija u uzorcima koristeći uređaj Tecan reader na ekscitaciji 553 nm i emisiji 578 nm. Također je, na isti način kao i kod enzima, mjerena koncentracija proteina u uzorcima (opisano u 2.3.2.).

#### **2.5. Statistička obrada podataka**

Nakon provedenog istraživanja dobiveni rezultati obrađeni su u statističkom programu GraphPad Prism 5. Shapiro-Wilk testom utvrđena je normalna distribucija podataka, stoga su u daljnjoj analizi podataka korišteni parametarski testovi za testiranje razlika između više skupina. S obzirom da u istraživanju postoji samo jedna nezavisna varijabla, korištena je jednofaktorska analiza varijance (*One-way ANOVA*). Primjenom Dunnett *post-hoc* testa utvrđene su razlike između pojedinih eksperimentalnih skupina. Rezultati testa izbjegavanja analizirani su t-testom. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5%.

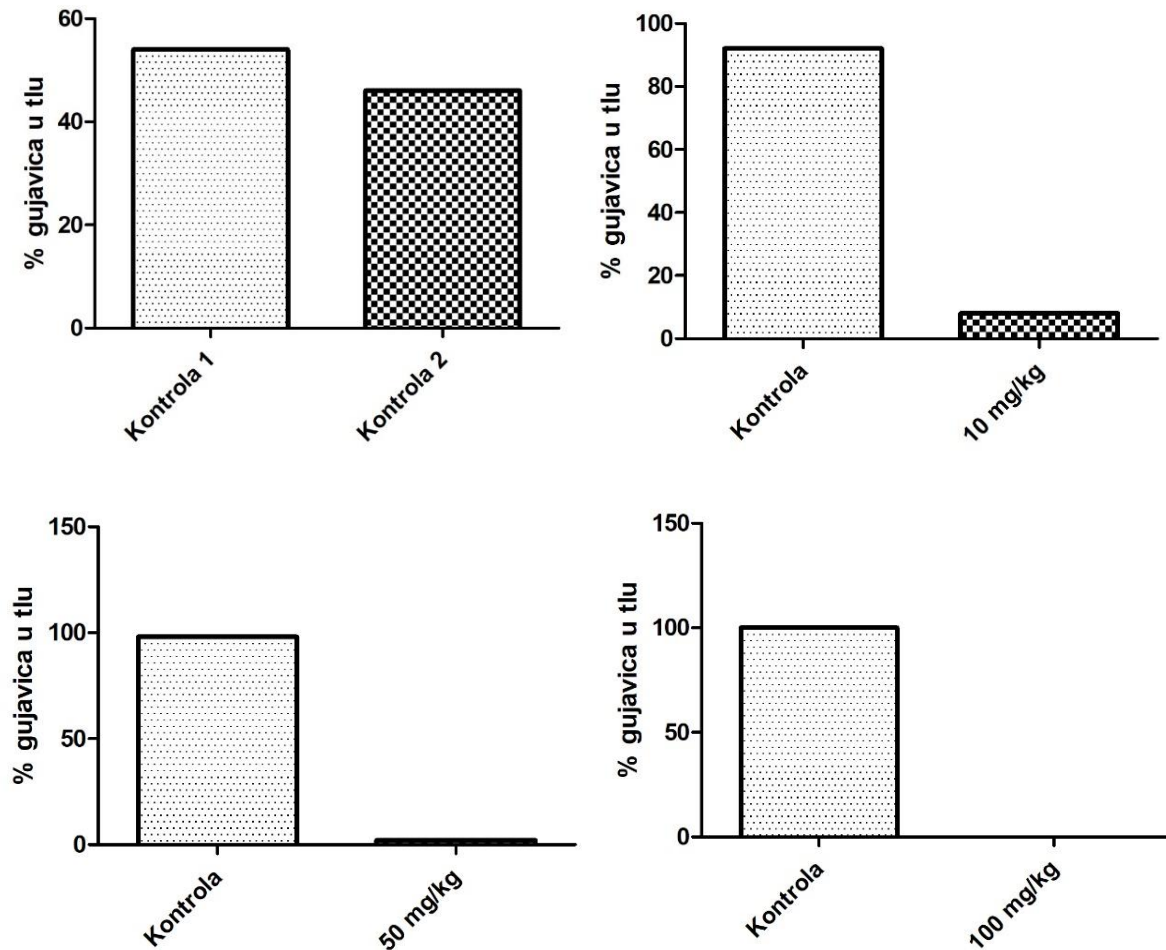
### **3. REZULTATI**

#### **3.1. Preliminarni test toksičnosti**

Proveden je preliminarni test toksičnosti kako bi se utvrdile koncentracije fungicida koje ne uzrokuju morfološke promjene ni ugibanje gujavica. Izlaganje je trajalo 48 h. Test je ponovljen tri puta s različitim koncentracijama. Utvrđeno je da na koncentraciji od 1000 mg/kg dolazi do ugibanja svih 10 izloženih gujavica. Koncentracija od 500 mg/kg uzrokuje grčenje i smrtnost, a na koncentraciji od 250 mg/kg zabilježene su morfološke promjene na gujavicama. Na kraju ovog testa odabrane su koncentracije fungicida (1, 10, 50 i 100 mg/kg) koje su kasnije korištene u testu izbjegavanja gujavica, određivanju enzimske aktivnosti i aktivnosti efluks crpke.

### 3.2. Test izbjegavanja

Na temelju rezultata dobivenih preliminarnim testom toksičnosti odabrane su tri koncentracije korištene za test izbjegavanja: 10, 50 i 100 mg/kg. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 3.



**Slika 3.** Prikaz raspodjele gujavica nakon 48 h izlaganja različitim koncentracijama fungicida.

U kontroli (obje strane kutije sadržavaju netretirano tlo) je došlo do nasumične raspodjele gujavica. Nakon uklanjanja pregrade izbrojane su gujovice s obje strane pregrade. Postotak gujavica s lijeve strane pregrade (kontrola 1) iznosio je 54 %, a s desne strane pregrade (kontrola 2) 46 %. Nije zabilježena statistički značajna razlika u raspodjeli gujavica u kontrolnom tlu.

Prebrojavanjem gujavica nakon 48 h izlaganja u kontrolnom tlu i tlu tretiranom fungicidom, koncentracije 10 mg/kg, zabilježeno je 92 % gujavica u kontrolnom tlu i 8 % gujavica u tretiranom tlu, te je postojala statistički značajna razlika u raspodjeli gujavica (Tablica 2).

Prebrojavanjem gujavica u kontrolnom tlu i tlu tretiranom fungicidom koncentracije 50 mg/kg, 48 h nakon izlaganja, zabilježeno je 98 % gujavica u kontrolnom tlu i 2 % gujavica u tretiranom tlu. Postojala je statistički značajna razlika u raspodjeli gujavica (Tablica 2).

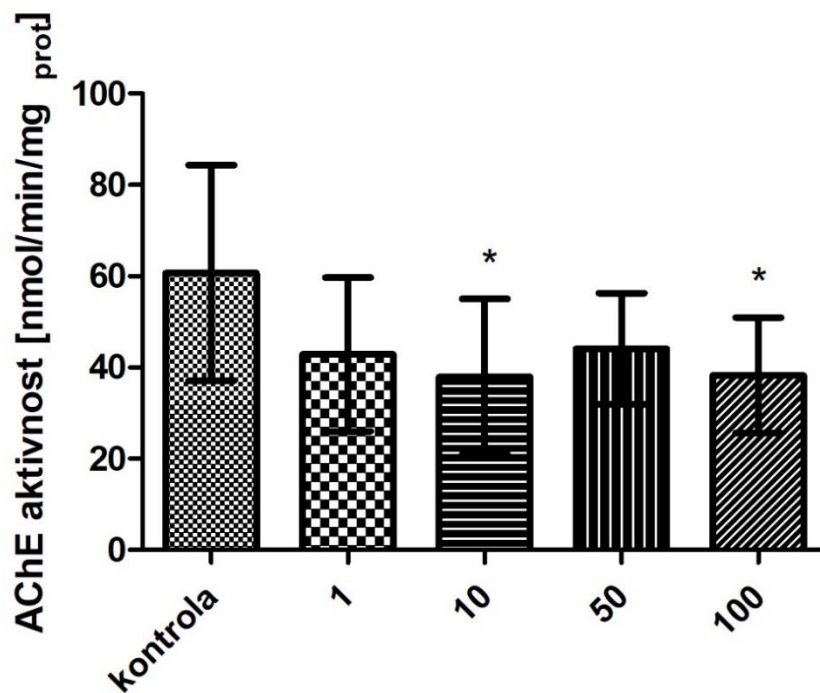
Prebrojavanjem gujavica u kontrolnom tlu i tlu tretiranom fungicidom koncentracije 100 mg/kg, 48 h nakon izlaganja fungicidu, nije zabilježena niti jedna gujavica u tretiranom tlu u tri replike, već su se sve gujavice nalazile u kontrolnom tlu. I u ovom slučaju je postojala statistički značajna razlika u raspodjeli gujavica (Tablica 2). Dobiveni rezultati ukazuju da gujavice izbjegavaju tlo tretirano istraživanim fungicidom.

**Tablica 2.** Utjecaj različitih koncentracija fungicida Pyrus na ponašanje gujavice *Eisenia andrei*. Statistički značajna razlika označena je kao: \*\*\* $p < 0.001$ .

Koncentracija Pyrus (mg/kg)	Raspodjela gujavica (%)		Odgovor izbjegavanja (%)
	Kontrolno tlo	Tretirano tlo	
10 ***	92	8	84,44
50 ***	98	2	95,55
100 ***	100	0	100

### 3.3. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE)

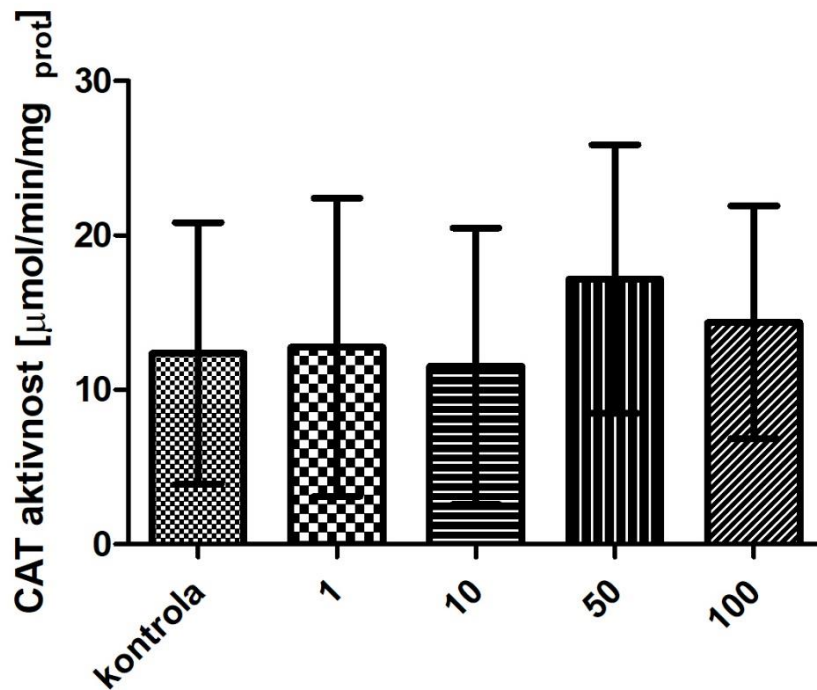
Nakon 48 h izlaganja gujavica fungicidu mjerena je aktivnost enzima AChE. Rezultati mjerenja ukazuju na trend smanjenja aktivnosti AChE na svim koncentracijama iako smanjenje nije statistički značajno u svim testiranim skupinama. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu zabilježena je u skupinama gujavica izlaganih fungicidu koncentracijama 10 i 100 mg/kg (Slika 4).



**Slika 4.** Aktivnost AChE u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama fungicida (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). Statistički značajne razlike označene su kao: \* ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima katalaze (CAT)

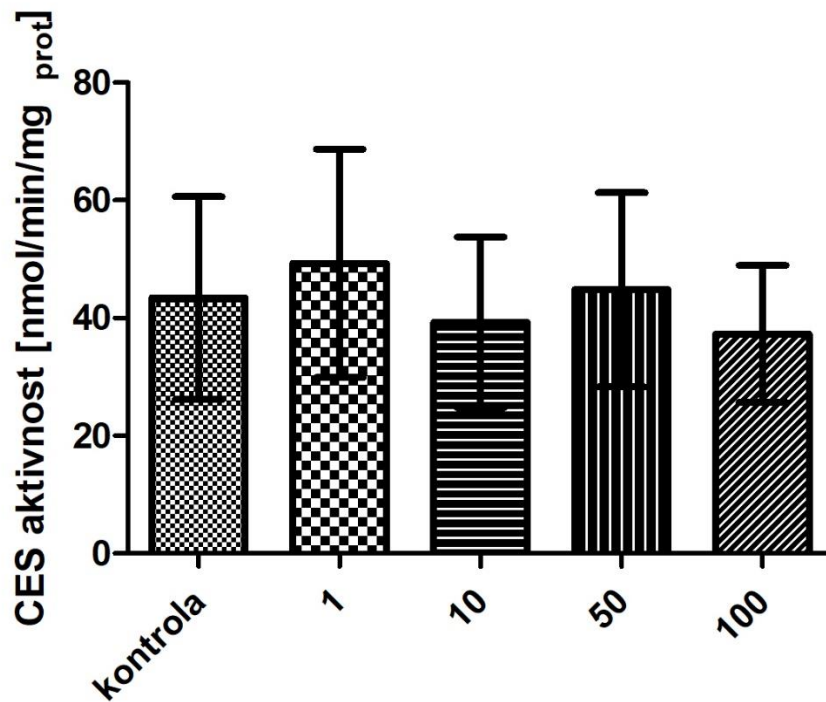
Mjerena je aktivnost enzima CAT 48 h nakon izlaganja gujavica fungicidu. Nije zabilježena statistički značajna promjena u aktivnosti enzima u izloženim skupinama u odnosu na kontrolu ( $p > 0.05$ ) (Slika 5).



**Slika 5.** Aktivnost CAT u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama fungicida (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). Nije zabilježena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu.

### 3.5. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima karboksilesteraze (CES)

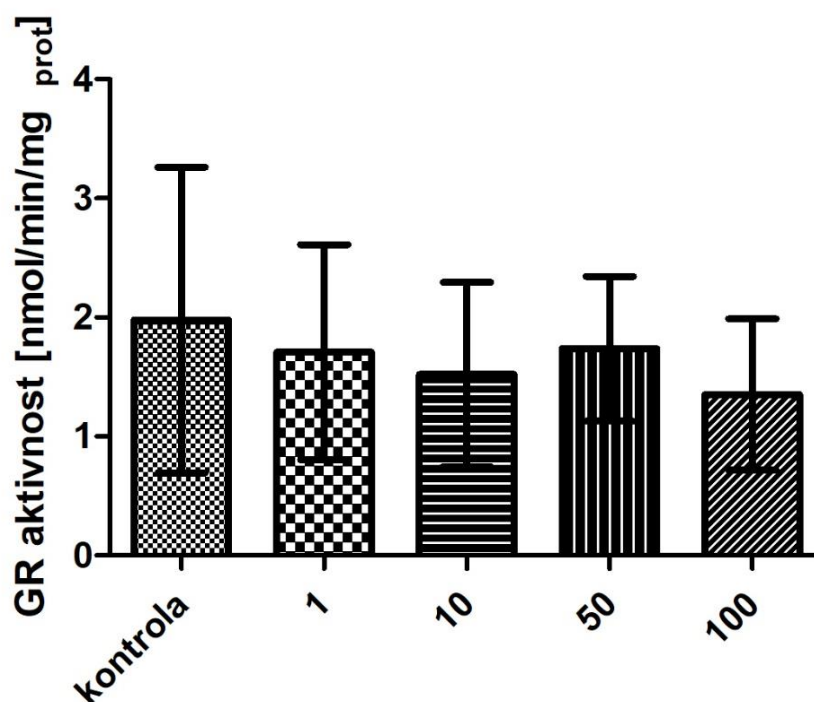
Aktivnost enzima CES mjerena je 48 h nakon izlaganja gujavica fungicidu. Nije zabilježena statistički značajna promjena u aktivnosti enzima u izloženim skupinama u odnosu na kontrolu ( $p > 0.05$ ) (Slika 6).



**Slika 6.** Aktivnost CES u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama fungicida (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). Nije zabilježena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu.

### 3.6. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima glutation reduktaze (GR)

48 h nakon izlaganja gujavica fungicidu mjerena je aktivnost enzima GR. Zabilježen je trend smanjenja aktivnosti enzima GR na svim koncentracijama, ali ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (Slika 7).

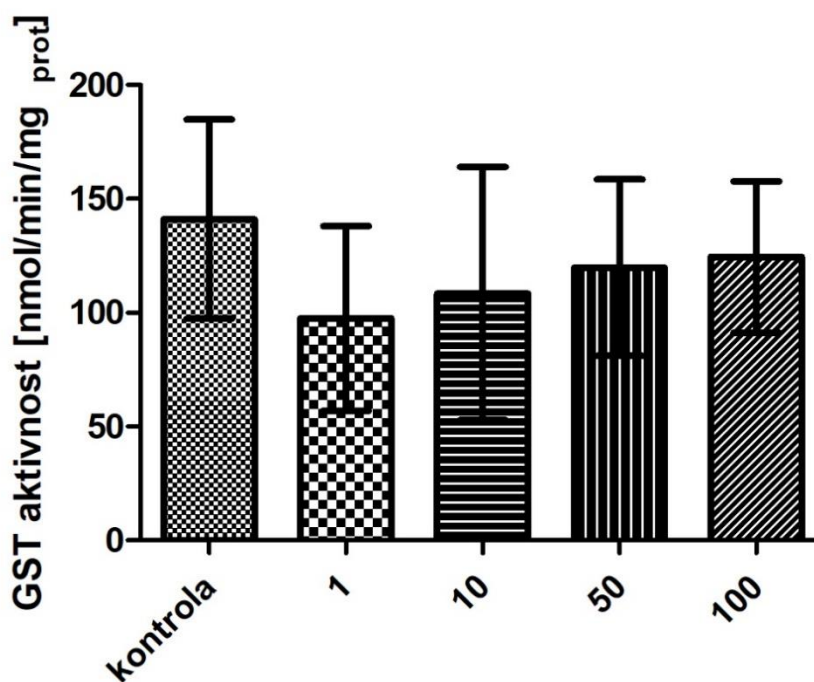


**Slika 7.** Aktivnosti GR u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama fungicida (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). Nije zabilježena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu.



### 3.7. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST)

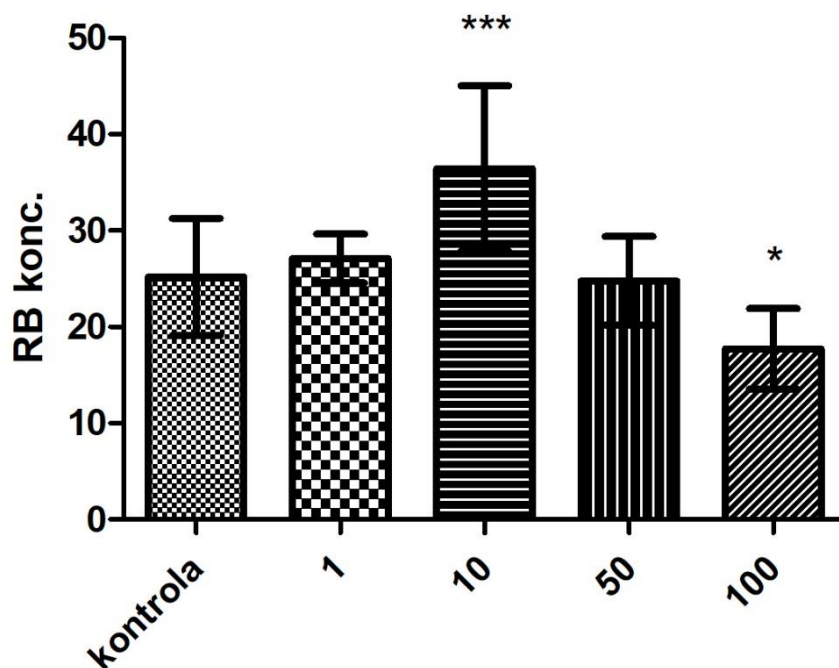
Aktivnost GST mjerena je 48 h nakon izlaganja gujavica fungicidu. Zabilježen je trend smanjenja aktivnosti enzima GST na svim koncentracijama, ali statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu nije utvrđena ( $p > 0.05$ ) (Slika 8).



**Slika 8.** Mjerenje aktivnosti GST u gujavicama nakon 48h izlaganja različitim koncentracijama fungicida (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). Nije zabilježena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu.

### 3.8. Utjecaj fungicida Pyrus na aktivnost efluks crpke kod gujavice *Eisenia andrei*

48 h nakon izlaganja fungicidu mjerena je koncentracija Rodamina B u gujavicama. Pri izlaganju niskim koncentracijama zabilježeno je povećanje koncentracije Rodamina B što ukazuje na smanjenje aktivnosti efluks crpke. S druge strane, na većim koncentracijama zabilježeno je smanjenje koncentracije Rodamina B što ukazuje na indukciju aktivnosti efluks crpke. Zabilježena je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu u skupini gujavica izlaganih koncentraciji 10 mg/kg ( $p < 0.001$ ) i koncentraciji 100 mg/kg ( $p < 0.05$ ) (Slika 9).



**Slika 9.** Koncentracija Rodamina B (RB) u gujavicama 48 h nakon izlaganja različitim koncentracijama fungicida (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija). Statistički značajne razlike označene su kao: \* ( $p < 0.05$ ) i \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

## 4. RASPRAVA

Rast populacije ljudi povezan je s povećanim potrebama za proizvodnjom hrane. U svrhu poboljšanja poljoprivrednih usjeva i optimizacije proizvodnje hrane koriste se zaštitna sredstva, a u borbi protiv gljivica koriste se fungicidi (Hirooka i Ishii, 2013). U provedenom istraživanju ispitivao se učinak fungicida Pyrus 400 SC na gujavice vrste *Eisenia andrei*. Gujavice imaju važan učinak na razgradnju organske tvari, mineralizaciju nutrijenata i strukturu tla (Lee, 1985), no uslijed izloženosti različitim štetnim organskim ili anorganskim tvarima, ne mogu u potpunosti obavljati svoju ulogu u tlu (Edwards i Bohlen, 1996).

Pirimetamil, aktivna tvar sadržana u istraživanom fungicidu Pyrus 400 SC, pripada relativno novoj skupini fungicida, a s obzirom da je vrlo učinkovit u borbi protiv gljivica povećana je njegova upotreba u okolišu (Sholber i sur., 2005; Smilanick i sur., 2006; Xiao i Boal, 2009). Prvi korak u provođenju eksperimenta bio je određivanje subletalnih koncentracija fungicida Pyrus koje ne uzrokuju smrtnost niti morfološke promjene na gujavicama, a koje će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Preliminarnim testom toksičnosti utvrđeno je da koncentracije 1, 10, 50 i 100 mg/kg ne uzrokuju smrtnost niti morfološke promjene, stoga su upravo te koncentracije odabrane za primjenu u testu izbjegavanja, određivanju enzimske aktivnosti i aktivnosti efluks crpke. Do sada je utjecaj fungicida Pyrus 400 SC na gujavice istraživan u samo jednom radu gdje je primijenjen kontaktni filter papir test. Utvrđene su letalne koncentracije nakon 24 h, 48 h i 72 h. Nakon 24 h  $LC_{50}$  iznosio je:  $40.9 \pm 3.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , nakon 48 h:  $6.5 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , a nakon 72 h  $LC_{50}$  iznosio je:  $2.7 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Velki i sur., 2019). Izuzev toga, nije bilo drugih istraživanja utjecaja Pyrusa na gujavice. Međutim, pronađena su istraživanja o utjecaju pirimetanila na različite organizme.

Seeland i sur. (2013) utvrdili su da pirimetamil snažno inhibira embrionalni razvoj puža vrste *Physella acuta* i da se toksičnost povećava smanjenjem temperature. *Daphnia magna* (Straus, 1820) i *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) prilagođeni su životu na temperaturi oko 20 °C, ali su osjetljivije na niske koncentracije pirimetanila pri višim temperaturama (Müller i sur., 2012; Seeland i sur., 2012). Nadalje, osim temperature, vlažnost tla također ima važnu ulogu u osjetljivosti organizama na pirimetamil. Bandow i sur. (2016) utvrdili su da što je niža vlažnost tla veća je osjetljivost modelnih organizama Enchytraeidae na pirimetamil, dok su Bernabò i sur. (2016) utvrdili su da pirimetamil dovodi do smanjene sposobnosti metamorfoze kod vrste *Hyla intermedia*. Tretiranje fungicidima u blizini vodenih površina može imati negativne posljedice na neciljne organizme te kemijske i mikrobiološke procese (Fernández i sur., 2005). Prisutnost pirimetanila u okolišu može imati štetne posljedice na slijedeće skupine

organizama: alge *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Scenedesmus acutus*, makrofita *Lemna minor*, kladocera *Daphnia magna* i *Ceriodaphnia silvestrii*, kukce *Chironomus riparius*, slatkovodnog puža vrste *Physella acuta*, ribe vrste *Oncorhynchus mykiss* te člankonošce reda Collembola (Verdisson i sur., 2001; van Leeuwen i Vonk 2008; Müller i sur., 2012; Seeland i sur., 2012, 2013; Bandow i sur., 2014).

Gujavice pomoću kemoreceptora osjećaju prisutnost štetnih tvari i migriraju prema nekontaminiranom okolišu (Lukkari i sur., 2005; Reinecke i sur., 2002). Izbjegavanje je brz i osjetljiv odgovor na različita zagađivala te može imati posljedice na emigraciju jedinki i posljedično na strukturu zajednice i dinamiku ekosustava (Rosa i sur., 2012; Araújo i sur., 2012). Uzimajući u obzir važnu ulogu gujavica u kvaliteti i funkciji tla (Lavelle i sur., 2006) i njihovu osjetljivost na štetne tvari u okolišu (Römbke i sur., 2005), test izbjegavanja smatra se učinkovitim, ali i financijski isplativom metodom za procjenu zagađenja tla (Lukkari i sur., 2005; Weeks i sur., 2005). U provedenom eksperimentu gujavice su izlagane subletalnim koncentracijama fungicida kako bi se utvrdilo utječe li pirimetanil na ponašanje gujavica te je zabilježen snažan odgovor izbjegavanja tretiranog tla. Na najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 10 mg/kg zabilježeno je samo 8 % gujavica u tretiranom tlu, a 92 % u kontrolnom, netretiranom tlu. Na najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 100 mg/kg, odgovor izbjegavanja iznosio je 100 %, odnosno nije zabilježena niti jedna gujavica u tretiranom tlu, već su se sve gujavice nalazile u kontrolnom tlu. Pretraživanjem literature nisu pronađena druga istraživanja utjecaja pirimetanila na ponašanje gujavica, ali su pronađena istraživanja na dvije vrste punoglavaca te vrsti *Danio rerio*. Provedenim testom izbjegavanja utvrđeno je da dvije vrste punoglavaca (*Leptodactylus latrans* i *Lithobates catesbeianus*) izbjegavaju područje tretirano pirimetanilom i odlaze u nekontaminirano područje. Najveći odgovor izbjegavanja tretiranog tla bio je na najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 1.4 mg/L i iznosio je približno 50 %. Također je zaključeno da je izbjegavanje vrste *Leptodactylus latrans* bilo intenzivnije u odnosu na drugu testiranu vrstu (Araújo i sur., 2014a). Araújo i sur. (2014b) proveli su istraživanje čiji je cilj bio utvrditi sposobnost izbjegavanja kontaminirane vode pirimetanilom kod vrste *Danio rerio* te su zaključili da pirimetanil potiče izbjegavanje kontaminiranog područja čak i na subletalnim koncentracijama te se stoga može smatrati da pirimetanil ima iritirajući učinak na vrstu *Danio rerio*. Iako nema drugih istraživanja djelovanja pirimetanila na ponašanje gujavica, dokazano je da i drugi pesticidi mogu utjecati na ponašanje gujavica. Primjerice, izlaganjem gujavica vrste *E. andrei* karbamatnom insekticidu metomilu utvrđeno je da gujavice izbjegavaju tlo tretirano insekticidom te da se stopa izbjegavanja povećava povećanjem koncentracija

insekticida (Pereira i sur., 2010). Također, Lackmann i sur. (2018) utvrdili su da gujavice vrste *E. andrei* izbjegavaju tlo tretirano herbicidima diuronom i fluazifop-p-butilom.

U ovom istraživanju mjerene su promjene u aktivnosti različitih enzima nakon izlaganja istraživanom fungicidu. Mjerena je aktivnost AChE (biomarker neurotoksičnosti), CAT i GR (biomarkeri oksidativnog stresa), CES (enzim I faze metabolizma) i GST (enzim II faze metabolizma). Nakon 48 h zabilježeno je smanjenje aktivnosti AChE na svim koncentracijama, ali statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu utvrđena je samo u dvije ispitivane koncentracije: 10 i 100 mg/kg. Mjerenjem aktivnosti ostalih enzima (CAT, GR, CES i GST) nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, iako je uočen blagi trend smanjenja aktivnosti GR i GST. Slične rezultate dobili su Mosleh i sur. (2014) istraživanjem utjecaja pirimetanila na aktivnost GST kod vrste *Tubifex tubifex*. Inhibicija aktivnosti AChE često se koristi kao biomarker izloženosti organofosfatima (Reinecke i Reinecke, 2007). Međutim, na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti da i fungicid Pyrus inhibira aktivnost AChE. Poznato je da i neke druge skupine pesticida mogu uzrokovati inhibiciju aktivnosti AChE, iako mehanizam takve inhibicije nije poznat. Primjerice, Velki i Hackenberger (2013b) utvrdili su da piretroidni insekticid deltametrin kod vrste *E. andrei* inhibira aktivnost AChE, a Stepić i sur. (2013) zabilježili su inhibiciju AChE nakon izloženosti insekticidu endosulfanu.

Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti smatra se prvom linijom obrane organizma te se može koristiti kao biomarker izloženosti organizma onečišćenju jer prisutnost ksenobiotika potiče aktivnost efluks crpke (Epel, 1998). U provedenom istraživanju zabilježeno je povećanje koncentracije Rodamina B na nižim koncentracijama (10 mg/kg) što je posljedica inhibicije efluks crpke (smanjeno je izbacivanje boje iz organizma). S druge strane, smanjenje koncentracije Rodamina B uočeno je na većim koncentracijama (100 mg/kg) što ukazuje na indukciju aktivnosti efluks crpke, odnosno povećano je izbacivanje štetnih i toksičnih tvari iz organizma. Velki i sur. (2019) proveli su kontaktni filter papir test u kojem su utvrdili da fungicid Pyrus 400 SC na najvećoj ispitivanoj koncentraciji (2.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dovodi do povećanja koncentracije Rodamina B u odnosu na kontrolu, što ukazuje na inhibiciju multiksenobiotičke aktivnosti kod gujavica vrste *E. andrei*. Nisu provedena druga istraživanja o utjecaju fungicida Pyrus 400 SC na aktivnost multiksenobiotičke aktivnosti kod gujavica, ali su provedena istraživanja s drugim pesticidima. Utvrđeno je da organofosfat dimetoat uzrokuje indukciju aktivnosti efluks crpke kod vrste *E. andrei* na najvećoj testiranoj koncentraciji, dok na nižim koncentracijama dovodi do inhibicije aktivnosti nakon duže izloženosti. Duža izloženost toksičnim tvarima dovodi do njihove povećane akumulacije u organizmu i posljedično do

inhibicije aktivnosti efluks crpke (Velki i Hackenberger, 2013a). Inhibicija aktivnosti efluks crpke zabilježena je nakon izloženosti *E. andrei* herbicidima diuronu i fluazifop-p-butilu (Lackmann i sur., 2018) te insekticidima pirimifos-metilu i deltametrinu (Velki i Hackenberger, 2013b). Promjena u aktivnosti efluks crpke dovodi do promjene u vremenu zadržavanja pesticida unutar stanica što može utjecati na toksičnost pesticida.

## 5. ZAKLJUČCI

U svrhu utvrđivanja utjecaja fungicida Pyrus 400 SC na gujavice proveden je preliminarni test toksičnosti, test izbjegavanja, mjerene su promjene u aktivnosti različitih enzima i aktivnosti efluks crpke. Istraživanje je provedeno na vrsti *Eisenia andrei* koja je izlagana različitim koncentracijama fungicida. Na temelju rezultata dobivenih provedenim istraživanjem zaključeno je slijedeće:

- Fungicid Pyrus 400 SC ima značajan učinak na ponašanje gujavica na svim testiranim koncentracijama i dovodi do snažnog odgovora izbjegavanja tretiranog tla.
- Izlaganje gujavica fungicidu Pyrus 400 SC uzrokuje značajnu inhibiciju aktivnosti AChE.
- Izlaganje gujavica fungicidu Pyrus 400 SC ne uzrokuje značajne razlike u aktivnosti enzima CAT, GR, CES i GST.
- Izlaganje gujavica fungicidu Pyrus 400 SC dovodi do indukcije aktivnosti efluks crpke na većim koncentracijama te do inhibicije efluks crpke na nižim testiranim koncentracijama.

## 6. LITERATURA

Araújo, C. V., Blasco, J., Moreno-Garrido, I. (2012) Measuring the avoidance behaviour shown by the snail *Hydrobia ulvae* exposed to sediment with a known contamination gradient. *Ecotoxicology* 21: 750-758.

Araújo, C. V., Shinn, C., Vasconcelos, A. M., Ribeiro, R., Espíndola, E. L. (2014a) Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as a habitat disturber. *Ecotoxicology* 23: 851-860.

Araújo, C. V., Shinn, C., Mendes, L. B., Delello-Schneider, D., Sanchez, A. L., Espíndola, E. L. (2014b) Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment* 484: 36-42.

Athas, W. F., Hedayati, M. A., Matanoski, G. M., Farmer, E. R., Grossman, L. (1991) Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes. *Cancer research* 51: 5786-5793.

Bain, L. J., Leblanc, G. A. (1996) Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. *Toxicology and applied pharmacology* 141: 288-298.

Bandow, C., Karau, N., Römbke, J. (2014) Interactive effects of pyrimethanil, soil moisture and temperature on *Folsomia candida* and *Sinella curviseta* (Collembola). *Applied soil ecology* 81: 22-29.

Bandow, C., Ng, E. L., Schmelz, R. M., Sousa, J. P., Römbke, J. (2016) A TME study with the fungicide pyrimethanil combined with different moisture regimes: effects on enchytraeids. *Ecotoxicology* 25: 213-224.

Bard, S. M. (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48: 357-389.



Bécaert, V., Deschênes, L. (2006) Using soil health to assess ecotoxicological impacts of pollutants on soil microflora. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* 188: 127-148.

Bernabò, I., Guardia, A., Macirella, R., Sesti, S., Crescente, A., Brunelli, E. (2016) Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology* 172: 56-66.

Blanchette, B., Feng, X., Singh, B. R. (2007) Marine glutathione S-transferases. *Marine biotechnology* 9: 513-542.

Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., Cluzeau, D. (2013) A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* 64: 161-182.

Borges-Walmsley, M. I., Walmsley, A. R. (2001) The structure and function of drug pumps. *Trends in microbiology* 9: 71-79.

Bošnjak, I., Bielen, A., Babić, S., Šver, L., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Sauerborn Klobučar, R. (2014) First evidence of the P-glycoprotein gene expression and multixenobiotic resistance modulation in earthworm. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 65: 67-74.

Bouché, M. B. (1977) Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins* 25: 122-132.

Buckerfield, J. C., Lee, K. E., Davoren, C. W., Hannay, J. N. (1997) Earthworms as indicators of sustainable production in dryland cropping in southern Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 547-554.

Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. (2003) *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed., United States, Academic Press.

Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., Belzunces, L. (2003) Earthworm behaviour as a biomarker—a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47: 542-547.

Chen, C. H. (2011) Activation and detoxification enzymes: functions and implications. New York, Springer.

Chevillot, F., Convert, Y., Desrosiers, M., Cadoret, N., Veilleux, É., Cabana, H., Bellenger, J. P. (2017) Selective bioaccumulation of neonicotinoids and sub-lethal effects in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to environmental concentrations in an artificial soil. *Chemosphere* 186: 839–847.

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Molecular cell biology* 8: 813-824.

Davies, K. J. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61: 1-31.

De Silva, P. M. C. S., Amarasinghe, N. D. S. (2008) Assessment of dimethoate toxicity on compost worm (*Eisenia andrei*) using earthworm avoidance test. *Tropical Agricultural research* 20: 25-33.

De Silva, P. M. C., Pathiratne, A., van Gestel, C. A. (2009) Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. *Chemosphere* 76: 1410-1415.

Edwards, P. J., Coulson, J. M. (1992) Choice of earthworm species for laboratory tests. U: Greig-Smith, P. W., Becker, H., Edwards P. J., Heimbach, F. (ur.) *Ecotoxicology of earthworms*. Intercept, Andover, str.36-43.

Edwards, C. A., Bohlen, P. J. (1996) *Biology and ecology of earthworms*. 3rd ed., London, Chapman & Hall.

EFSA (European Food Safety Authority). (2006) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyrimethanil. *EFSA Scientific Report* 61: 1-70.

Epel, D. (1998) Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120: 23-28.

Fernández, M. J., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M. A. (2005) Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 804-811.

Fritz, R., Lanen, C., Colas, V., Leroux, P. (1997) Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* 49: 40-46.

Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular engineering* 23: 149-169.

Fründ, H. C., Graefe, U., Tischer, S. (2011) Earthworms as bioindicators of soil quality. U: Karaca A. (ur.) *Biology of earthworms*. Springer, Berlin, str.261-278.

Gajalakshmi, S., Abbasi, S. A. (2004) Earthworms and vermicomposting. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 486:494.

Gao, M., Lv, M., Han, M., Song, W., Wang, D. (2016) Avoidance behavior of *Eisenia fetida* in oxytetracycline and heavy metal-contaminated soils. *Environmental toxicology and pharmacology* 47: 119-123.

Georgiadis, G., Mavridis, C., Belantis, C., Zisis, I. E., Skamagkas, I., Fragkiadoulaki, I., Mamoulakis, C. (2018) Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology* 406: 129-136.

Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., Wu, L. (2011) Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 Market Estimates. United States, EPA.

Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M. C., Soares, A. M. (1998) Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned. *Biomarkers* 3: 157-163.

Gupta, R. C. (2014) Biomarkers in Toxicology. United States, Elsevier.

Habdija, I., Habdija, B. P., Radanović, I., Vidaković, J., Kučinić, M., Špoljar, M., Miliša, M. (2004) Protista-Protozoa and Metazoa-Invertebrata. Meridijani, Samobor.

Hackenberger, B. K., Velki, M., Stepić, S., Hackenberger, D. K. (2012) First evidence for the presence of efflux pump in the earthworm *Eisenia andrei*. Ecotoxicology and environmental safety 75: 40-45.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, USA.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 51-88.

Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annual review of cell biology 8: 67-113.

Hirooka, T., Ishii, H. (2013) Chemical control of plant diseases. Journal of general plant pathology 79: 390-401.

Hodgson, E. (2010) Introduction to biotransformation (metabolism). U: Krieger, R. (ur.) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, United States, str.865-875.

Hollingworth, R. M., Kurihara, N., Miyamoto, J., Otto, S., Paulson, G. D. (1995) Pesticides report 32: Detection and significance of active metabolites of agrochemicals and related xenobiotics in animals (Technical Report). Pure and applied chemistry 67: 1487-1532.

Hund-Rinke, K., Achazi, R., Römbke, J., Warnecke, D. (2003) Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. Journal of soils and Sediments 3: 7-12.

Huseth, A. S., Groves, R. L., Chapman, S. A., Nault, B. A. (2015) Evaluation of diamide insecticides co-applied with other agrochemicals at various times to manage *Ostrinia nubilalis* in processing snap bean. *Pest management science* 71: 1649-1656.

Ioannides, C. (2002) *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. United States, John Wiley & Sons.

Ivančan, N. (2009) Zaštita vinove loze u vegetaciji. *Glasnik zaštite bilja* 32: 43-52.

Jones, C. G., Lawton, J. H., Shachak, M. (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69: 373-386.

Kooch, Y., Jalilvand, H. (2008) Earthworms as ecosystem engineers and the most important detritivores in forest soils. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 819-825.

Lackmann, C., Velki, M., Seiler, T. B., Hollert, H. (2018) Herbicides diuron and fluazifop-p-butyl affect avoidance response and multixenobiotic resistance activity in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere* 210: 110-119.

Lackner, R. (1998) "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. U: Braunbeck T., Hinton D. E., Streit B. (ur.) *Fish ecotoxicology*. Birkhäuser, Basel, str.203-224.

Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3: 193-208.

Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Rossi, J. P. (2006) Soil invertebrates and ecosystem services. *European journal of soil biology* 42: 3-15.

Le Bayon, R. C., Moreau, S., Gascuel-Oudou, C., Binet, F. (2002) Annual variations in earthworm surface-casting activity and soil transport by water runoff under a temperate maize agroecosystem. *Geoderma* 106: 121-135.

LeBlanc, G. A. (2008) *Phase II—Conjugation of Toxicants*. U: Smart R. C., Hodgson E. (ur.) *Molecular and Biochemical Toxicology*. John Wiley & Sons, United States, str. 219-237.

Lee, K. E. (1985) Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use. Sydney, Academic Press.

Liu, T., Wang, X., Chen, D., Li, Y., Wang, F. (2018) Growth, reproduction and biochemical toxicity of chlorantraniliprole in soil on earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology and environmental safety* 150: 18-25.

Livingstone, D. R. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin* 42: 656-666.

Lockridge, O., Schopfer, L. M. (2006) Biomarkers of organophosphate exposure. U: Gupta, R. C. (ur.) *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*. Academic Press, Cambridge, str.703-711.

Lotti, M. (1995) Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry* 41: 1814-1818.

Lowe, C. N., Butt, K. R. (2005) Culture techniques for soil dwelling earthworms: a review. *Pedobiologia* 49: 401-413.

Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A. (2014) Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 165: 28-52.

Lukkari, T., Aatsinki, M., Väisänen, A., Haimi, J. (2005) Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology* 30: 133-146.

Mather, J. G., Christensen, O. M. (1998) Earthworm surface migration in the field: influence of pesticides using benomyl as test chemical. U: Sheppard S., Bembridge, J., Holmstrup M. (ur.) *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Setac-Press, United States, str.327-340.

Milling, R. J., Richardson, C. J. (1995) Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* 45: 43-48.

Mosleh, Y. Y., Mofeed, J., Afifi, M., Almaghrabi, O. A. (2014) Biological Effects of Pyrimethinal on Aquatic Worms (*Tubifex tubifex*) Under Laboratory Conditions. Bulletin of environmental contamination and toxicology 92: 85-89.

Müller, R., Seeland, A., Jagodzinski, L. S., Diogo, J. B., Nowak, C., Oehlmann, J. (2012) Simulated climate change conditions unveil the toxic potential of the fungicide pyrimethanil on the midge *Chironomus riparius*: a multigeneration experiment. Ecology and evolution 2: 196-210.

Navarro, S., Barba, A., Navarro, G., Vela, N., Oliva, J. (2000) Multiresidue method for the rapid determination—in grape, must and wine—of fungicides frequently used on vineyards. Journal of Chromatography A 882: 221-229.

O'Brien R.D. (1976) Acetylcholinesterase and Its Inhibition. U: Wilkinson C.F. (ur.) Insecticide Biochemistry and Physiology. Springer, Boston, str.271-296.

OECD, T. N. (1984) 207: Earthworm, acute toxicity tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 1: 1-9.

Oruç, E. Ö. (2010) Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. Pesticide biochemistry and physiology 96: 160-166.

Pao, S. S., Paulsen, I. T., Saier, M. H. (1998) Major facilitator superfamily. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 1-34.

Paoletti, M. G. (1999) The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agriculture, Ecosystems & Environment 74: 137-155.

Parkinson, A., Ogilvie, B. W. (2008) Biotransformation of xenobiotics. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons 7: 161-304.

Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L. L. (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32: 225-231.

Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandebulcke, F. (2014) Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34: 199-228.

Pereira, J. L., Antunes, S. C., Ferreira, A. C., Goncalves, F., Pereira, R. (2010) Avoidance behavior of earthworms under exposure to pesticides: is it always chemosensorial?. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 45: 229-232.

Quinlan, T., Spivack, S., Mossman, B. T. (1994) Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environmental health perspectives* 102: 79-87.

Reilly, T. J., Smalling, K. L., Orlando, J. L., Kuivila, K. M. (2012) Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere* 89: 228-234.

Reinecke, S. A., Reinecke, A. J. (2007) The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 244-251.

Reinecke, A. J., Maboeta, M. S., Vermeulen, L. A., Reinecke, S. A. (2002) Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 779-786.

Rorat, A., Vandebulcke, F. (2019) Earthworms converting domestic and food industry wastes into biofertilizer. U: Prasad, M. N. V., Favas, P. J. C., Vithanage, M., Mohan, S. V. (ur.) *Industrial and Municipal Sludge*. Butterworth-Heinemann, Oxford, str.83-106.

Rosa, R., Materatski, P., Moreira-Santos, M., Sousa, J. P., Ribeiro, R. (2012) A scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. *Environmental toxicology and chemistry* 31: 1301-1305.



Römbke, J., Jänsch, S., Didden, W. (2005) The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 249-265.

Saier Jr, M. H., Paulsen, I. T. (2001) Phylogeny of multidrug transporters. U: Davey, J. (ur.) *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, USA, str.205-213.

Saier Jr, M. H., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C., Pao, S. S. (1999) The major facilitator superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 257-279.

Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Leemans, R. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.

Sathe, T.V. (2004) *Vermiculture and Organic Farming: Vermiculture and vermicomposting*. New Delhi, Daya Publishing House.

Scheffczyk, A., Frankenbach, S., Jänsch, S., Römbke, J. (2014) Comparison of the effects of zinc nitrate-tetrahydrate and tributyltin-oxide on the reproduction and avoidance behavior of the earthworm *Eisenia andrei* in laboratory tests using nine soils. *Applied soil ecology* 83: 253-257.

Seeland, A., Albrand, J., Oehlmann, J., Müller, R. (2013) Life stage-specific effects of the fungicide pyrimethanil and temperature on the snail *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) disclose the pitfalls for the aquatic risk assessment under global climate change. *Environmental pollution* 174: 1-9.

Seeland, A., Oehlmann, J., Müller, R. (2012) Aquatic ecotoxicity of the fungicide pyrimethanil: Effect profile under optimal and thermal stress conditions. *Environmental pollution* 168: 161-169.

Sholberg, P. L., Bedford, K., Stokes, S. (2005) Sensitivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop protection* 24: 127-134.

Silbergeld, E. K. (1993) Neurochemical approaches to developing biochemical markers of neurotoxicity: review of current status and evaluation of future prospects. *Environmental research* 63: 274-286.

Singh, J. (2018) Role of Earthworm in Sustainable Agriculture. U: Galanakis C.M. (ur.) *Sustainable Food Systems from Agriculture to Industry*. Academic Press, United States, str.83-122.

Singh, J., Kaur, A., Vig, A. P. (2014) Bioremediation of distillery sludge into soil-enriching material through vermicomposting with the help of *Eisenia fetida*. *Applied biochemistry and biotechnology* 174: 1403-1419.

Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., Goodwine, W. R. (2006) The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biology and Technology* 42: 75-85.

Stephenson, G. L., Kaushik, A., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., Steele, T., Scroggins, R. P. (1998) Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. U: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M., Phostuma, L. (ur.) *Advances in earthworm ecotoxicology*. SETAC, Amsterdam, str.67-81.

Stepić, S., Hackenberger, B. K., Velki, M., Lončarić, Ž., Hackenberger, D. K. (2013) Effects of individual and binary-combined commercial insecticides endosulfan, temephos, malathion and pirimiphos-methyl on biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental toxicology and pharmacology* 36: 715-723.

Storey, K. B. (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1715-1733.

Suthar, S. (2012) Vermistabilization of wastewater sludge from milk processing industry. *Ecological engineering* 47: 115-119.

Šmídová, K., Šerá, J., Bielská, L., Hofman, J. (2015) Influence of feeding and earthworm density on compound bioaccumulation in earthworms *Eisenia andrei*. Environmental pollution 207: 168-175.

Thuiller, W. (2007) Biodiversity: climate change and the ecologist. Nature 448: 550-552.

Timbrell, J. A. (1998) Biomarkers in toxicology. Toxicology 129: 1-12.

Tomlin, A. D. (1992) Behaviour as a source of earthworm susceptibility to ecotoxicants. Ecotoxicology of earthworms. Andover, Intercept.

Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer research 41: 1967-1972.

Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Plesiat, P., Pechere, J. C., Tulkens, P. M. (2003) Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 1055-1065.

Van Gestel, C. A. M., Van Brummelen, T. C. (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology 5: 217-225.

van Leeuwen, L., Vonk, J. W. (2008) Environmental risk limits for pyrimethanil. RIVM Letter report 601716010.

Velki, M., Hackenberger, B. K. (2013a) Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. Soil Biology and Biochemistry 57: 100-108.

Velki, M., Hackenberger, B. K. (2013b) Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. Chemosphere 90: 1216-1226.

Velki, M., Weltmeyer, A., Seiler, T. B., Hollert, H. (2019) Acute toxicities and effects on multixenobiotic resistance activity of eight pesticides to the earthworm *Eisenia andrei*. Environmental Science and Pollution Research 26: 4821-4832.

Verdisson, S., Couderchet, M., Vernet, G. (2001) Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. Chemosphere 44: 467-474.

Waechter, F., Weber, E., Hertner, T., May-Hertl, U. (2010) Cyprodinil: a fungicide of the anilinopyrimidine class. U: Krieger, R. (ur.) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, United States, str.1903-1913.

Walker, C. H., Sibly, R. M., Peakall, D. B. (2016) Principles of ecotoxicology. 2nd ed., London, Taylor & Francis.

Wang, Y., Cang, T., Yu, R., Wu, S., Liu, X., Chen, C., Cai, L. (2016) Joint acute toxicity of the herbicide butachlor and three insecticides to the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. Environmental Science and Pollution Research 23: 11766-11776.

Ward, A., Hoyle, C., Palmer, S., O'Reilly, J., Griffith, J., Pos, M., Henderson, P. (2001) Prokaryote multidrug efflux proteins of the major facilitator superfamily: amplified expression, purification and characterisation. Journal of molecular microbiology and biotechnology 3: 193-200.

Ward Jr, J. B., Ammenheuser, M. M., Bechtold, W. E., Whorton Jr, E. B., Legator, M. S. (1994) hprt mutant lymphocyte frequencies in workers at a 1, 3-butadiene production plant. Environmental health perspectives 102: 79-85.

Ward Jr, J. B., Henderson, R. E. (1996) Identification of needs in biomarker research. Environmental health perspectives 104: 895-900.

Weeks, J. M., Comber, S. D. W. (2005) Ecological risk assessment of contaminated soil. Mineralogical Magazine 69: 601-613.

Wiencke, J. K., Pemble, S., Ketterer, B., Kelsey, K. T. (1995) Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 4: 253-259.

Williams, R. T. (1959) *Detoxication mechanisms: the metabolism and detoxication of drugs, toxic substances, and other organic compounds*. United States, Wiley.

Winston, G. W., Di Giulio, R. T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology* 19: 137-161.

Xiao, C. L., Boal, R. J. (2009) Residual activity of fludioxonil and pyrimethanil against *Penicillium expansum* on apple fruit. *Plant disease* 93: 1003-1008.

Yasmin, S., D'Souza, D. (2007) Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 529– 532.

Yeardley Jr, R. B., Gast, L. C., Lazorchak, J. M. (1996) The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 15: 1532-1537.

Web1. [http://pinova.hr/hr\\_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/fungicidi/kontaktno-sistemicni-fungicidi/pyrus-400-sc](http://pinova.hr/hr_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/fungicidi/kontaktno-sistemicni-fungicidi/pyrus-400-sc)

Web2. <https://agrochem-maks.com/proizvod/pyrus-400-sc/>.

Web3. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/7-niches-within-earthworms-habitat>