

Utjecaj herbicida na ponašanje i molekularne biomarkere u gujavici *Eisenia andrei*

Tunuković, Tea

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:367736>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

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

Tea Tunuković

**Utjecaj herbicida na ponašanje i molekularne biomarkere u
gujavici *Eisenia andrei***

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Diplomski rad
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ HERBICIDA NA PONAŠANJE I MOLEKULARNE BIOMARKERE U GUJAVICI *Eisenia andrei*

Tea Tunuković

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Osijek
Mentor: Dr. sc. Mirna Velki, docent

Kratak sažetak diplomskog rada:

S obzirom da intenzivna upotreba pesticida u poljoprivredi može imati štetan učinak za ekosustav tla i organizme u tlu, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak herbicida Koban T, kombiniranog pripravka koji sadrži aktivne tvari petoksamid i terbutilazin, na gujavice vrste *Eisenia andrei*. S obzirom na mali broj istraživanja i općenito nedostatak informacija o djelovanju ovog herbicida na gujavice, u ovom radu istražen je utjecaj kombiniranog herbicida Koban T na ponašanje gujavica, aktivnost enzima karboksilesteraze (CES), katalaze (CAT), glutation-reduktaze (GR), glutation S-transferaze (GST) te na aktivnost mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR). Primjenom testa s umjetnim tlom i mjerenjem navedenih parametara utvrđeno je da istraživani herbicid u gujavica uzrokuje izbjegavanje tretiranog tla, promjene u aktivnost enzima te inhibiciju aktivnosti MXR.

Broj stranica: 61

Broj slika: 20

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 169

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: petoksamid, terbutilazin, herbicid, test izbjegavanja, biomarkeri, mehanizam multiksenobiotičke otpornosti, *Eisenia andrei*

Datum obrane: 27.9.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Doc.dr.sc. Sandra Ečimović**, predsjednik povjerenstva;
2. **Doc.dr.sc. Mirna Velki**, mentor i član;
3. **Doc.dr.sc. Zorana Katanić**, član
4. **Doc.dr.sc. Senka Blažetić**, zamjenik člana

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

MS thesis

Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

EFFECTS OF HERBICIDE ON BEHAVIOR AND MOLECULAR BIOMARKERS IN EARTHWORM
Eisenia andrei

Tea Tunuković

Thesis performed at: Department of Biology, Osijek

Supervisor: Mirna Velki, PhD, Assistant Professor

Short abstract:

Since intensive use of pesticides in agriculture can have a detrimental effect on soil ecosystems and soil organisms, the aim of this study was to assess the impact of the herbicide Koban T, formulation which contains active substances pethoxamide and terbuthylazine, on earthworms *Eisenia andrei*. Given the small number of studies, and generally the lack of information on the effects of this herbicide on earthworms, in this study effects of herbicide Koban T on the behavior of earthworms, the activity of the enzymes carboxylesterase (CES), catalase (CAT), glutathione-reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), and the activity of multixenobiotic resistance (MXR) were assessed. Using an artificial soil test and measuring the above mentioned parameters, it was found that investigated herbicide causes the avoidance of treated soil, changes in enzyme activities and inhibition of MXR activity in earthworms.

Number of pages: 61

Number of figures: 20

Number of tables: 6

Number of references: 169

Original in: Croatian

Keywords: pethoxamide, terbuthylazine, herbicide, avoidance test, biomarkers, multixenobiotic resistance, *Eisenia andrei*

Date of the thesis defence: 27th September 2019

Reviewers:

1. **Sandra Ečimović**, PhD, Assistant Professor, commission president
2. **Mirna Velki**, PhD, Assistant Professor, supervisor and member
3. **Zorana Katanić**, PhD, Assistant Professor, member
4. **Senka Blažetić**, PhD, Assistant Professor, substitute

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in the National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mirni Velki na prenesenom znanju, strpljenju i pomoći prilikom izvođenja i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala svim kolegama koji su mi uljepšali studentske dane i svojim znanjem doprinijeli mom obrazovanju.

Hvala prijateljima i obitelji koji su uvijek imali razumijevanja i pružali mi podršku kada je bilo teško.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su mi sve omogućili i uvijek vjerovali u mene!

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Pesticidi..... | 1 |
| 1.1.1. Štetne posljedice pesticida | 3 |
| 1.2. Gujavice | 4 |
| 1.2.1. Biologija i ekologija gujavica | 4 |
| 1.2.2. Uloga gujavica u tlu | 6 |
| 1.2.3. Gujavice kao modelni organizam u ekotoksikološkim istraživanjima..... | 6 |
| 1.2.4. Istraživanja utjecaja pesticida na gujavice | 8 |
| 1.3. Istraživani pesticid | 9 |
| 1.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva petoksamida..... | 10 |
| 1.3.2. Fizikalno-kemijska svojstva terbutilazina..... | 11 |
| 1.3.3. Dosadašnja istraživanja toksičnih učinaka petoksamida i terbutilazina na gujavice | 12 |
| 1.4. Biomarkeri | 13 |
| 1.4.1. Test izbjegavanja..... | 14 |
| 1.4.2. Karboksilesteraza (CES) | 14 |
| 1.4.3. Katalaza (CAT) | 16 |
| 1.4.4. Glutation-reduktaza (GR)..... | 16 |
| 1.4.5. Glutation S-transferaza (GST) | 17 |
| 1.4.6. Mehanizam multiksenobitičke otpornosti (MXR) | 18 |
| 1.5. Cilj istraživanja | 19 |
| 2. MATERIJALI I METODE..... | 20 |
| 2.1. Eksperimentalni organizam | 20 |
| 2.1.1. Sistematika i biologija gujavice (<i>Eisenia andrei</i>) | 20 |
| 2.1.2. Priprema za eksperimente | 20 |
| 2.2. Test izbjegavanja | 21 |
| 2.3. Učinak pesticida na enzimске aktivnosti gujavica | 22 |
| 2.3.1. Priprema postmitohondrijske (S9) frakcije | 23 |
| 2.3.2. Određivanje aktivnosti enzima karboksilesteraze (CES)..... | 24 |
| 2.3.3. Određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT)..... | 24 |
| 2.3.4. Određivanje aktivnosti enzima glutacion reduktaze (GR)..... | 25 |
| 2.3.5. Određivanje aktivnosti enzima glutacion S-transferaze (GST) | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.3.6. Određivanje koncentracije ukupnih proteina | 25 |
| 2.4. Određivanje aktivnosti mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR)..... | 26 |
| 2.5. Statistička obrada podataka | 27 |
| 3. REZULTATI | 28 |
| 3.1. Test izbjegavanja | 28 |
| 3.2. Aktivnost karboksilesteraze (CES) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu | 28 |
| 3.3. Aktivnost katalaze (CAT) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu | 31 |
| 3.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu | 33 |
| 3.5. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu | 36 |
| 3.6. Aktivnost mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR) 48 h nakon izlaganja pesticidu | 38 |
| 4. RASPRAVA..... | 40 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 44 |
| 6. LITERATURA | 45 |

1. UVOD

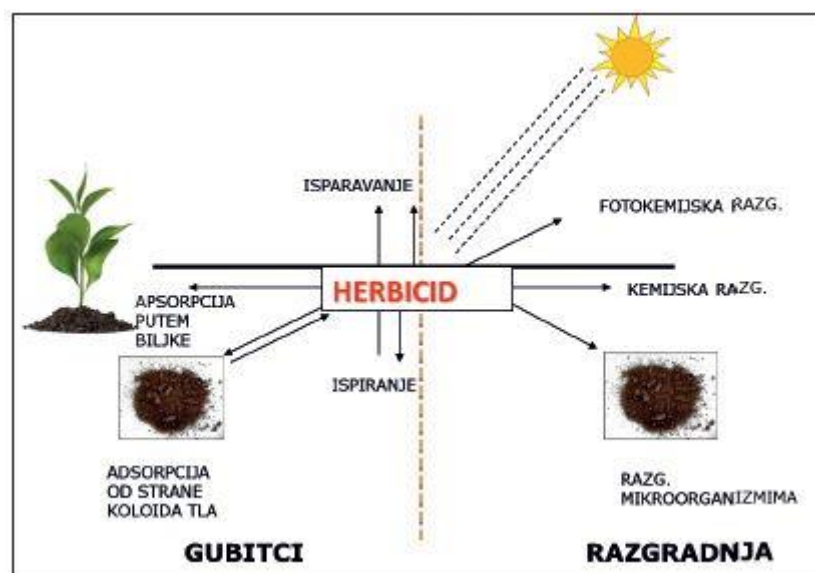
1.1. Pesticidi

Poznato je da se pesticidi primjenjuju dugi niz godina, a sinteza novih spojeva i njihova primjena neprestano se povećava. Danas je bez primjene pesticida nemoguće zamisliti suvremenu poljoprivrednu proizvodnju. Postoje različite definicije pesticida, prema Stenersen (2004), pesticidi su kemikalije posebno razvijene i proizvedene za uporabu u kontroli poljoprivrednih štetnika, za povećanje proizvodnje hrane i vlakana te za olakšavanje modernih poljoprivrednih tehnika. Pesticidi se definiraju kao otrovne kemijske tvari ili mješavine tvari koje se namjerno ispuštaju u okoliš, kako bi se spriječile, odvratile, kontrolirale ili uništile populacije kukaca, korova, glodavaca, gljiva ili drugih štetnika (Mahmood i sur., 2016). Pesticidi koji nakon primjene dopiru u okoliš, razgrađuju se fotokemijski, kemijski i mikrobiološki (Slika 1). Neki pesticidi koji mogu apsorbirati UV-svjetlost se fotodegradiraju. Prilikom kemijske razgradnje dolazi do reakcija redukcije, hidrolize, oksidacije ili izomerizacije, a mikrobiološka razgradnja odnosi se na spor proces razgradnje pomoću prisutnih mikroorganizama, bakterija (Dokić i sur., 2012). Pesticidi nestaju i disperzijom, isparavanjem ili ispiranjem u površinske i podzemne vode, ili ostaju prisutni u tlu (van der Werf, 1996).

Uporaba pesticida nije ograničena samo na poljoprivredne površine, nego se koriste i na javnim površinama, u javnom zdravstvu, a primjenjujemo ih i u kućanstvu u obliku sprejeva, otrova i prašaka. Širom svijeta dolazi do gubitaka od 40% poljoprivrednih proizvoda zbog bolesti biljaka, korova i štetnika. Gubitci usjeva bili bi mnogo veći da poljoprivredne površine nisu tretirane pesticidima (Webster i sur., 1999). Pesticidi mogu biti prirodni spojevi ili se mogu sintetski proizvesti. Postoje tri glavne podjele pesticida: prema načinu djelovanja, na temelju djelovanja na ciljne organizme i prema kemijskoj strukturi pesticida (Stenersen, 2004). Najčešće se primjenjuje podjela na temelju djelovanja pojedinog pesticida na ciljnu skupinu organizama. Na taj način pesticidi su podjeljeni u 11 skupina (Maceljki i sur., 1997): akaricidi, algicidi, avicidi, baktericidi, fungicidi, herbicidi, insekticidi, moluscidi, nematocidi, rodenticid i virucidi. Aktivne tvari koje sadrže pesticidi dijele se prema načinu djelovanja i prema mehanizmu djelovanja. Način djelovanja ovisi o tome kako organizam usvaja pesticid i kakva je pokretljivost usvojenog pesticida u štetnom organizmu. Mehanizam djelovanja rezultira ometanjem

jednog ili više biokemijskog procesa, nakon ulaska aktivne tvari u organizam (Bokulić i sur., 2015).

Herbicidi su kemijske tvari namijenjene za suzbijanje i zaustavljanje rasta nepoželjnih biljnih vrsta, poput korova (Klapec i sur., 2010). Korovi, posebice trave i višegodišnji korovi mogu postati problem, kako u sustavima bez obrade tla, tako i u sustavima smanjene obrade tla (Zarea, 2010; Pleasant i sur., 1990). Utjecaj korova na usjeve i povrće jedna je od glavnih komponenti smanjenja prinosa na poljoprivrednim površinama, povećanja troškova proizvodnje i smanjenja kvalitete. Herbicidi se primjenjuju na 92 do 97% površine na kojoj je zasađen kukuruz, pamuk, soja i citrusi; tri četvrtine površine povrća; i dvije trećine površine na kojoj su zasađene jabuke i druge voćke (Stenersen, 2004). U razvijenim zemljama herbicidi čine više od 70% ukupnih pesticida dostupnih na tržištu (Muthukaruppan i sur., 2005). U Europskoj uniji (EU) postoji oko 500 aktivnih tvari odobrenih za uporabu u pesticidima, s godišnjom prodajom od 374 000 tona pesticida (prosječni podaci od 2011. do 2016. za EU) (Silva i sur., 2019). Niske cijene herbicida u usporedbi s drugim strategijama, potiču poljoprivrednike da koriste takve metode za suzbijanje korova (Zarea i sur., 2010).



Slika 1. Procesi gubitaka i razgradnje herbicida u okolišu (Web 1).

1.1.1. Štetne posljedice pesticida

Pesticidi mogu imati negativne učinke na neciljne organizme, utjecati na vodene i kopnene hranidbene mreže i ekosustave (Mahmood i sur., 2016). Intenzivna upotreba pesticida u poljoprivredi često rezultira gubitkom biološke raznolikosti (Hole i sur., 2005). Oko 80 do 90% primijenjenih pesticida na poljoprivrednim površinama može ispariti kroz nekoliko dana nakon primjene (Majewski i Capel, 1996). Pesticidi isparavaju u zrak i mogu uzrokovati oštećenje drugih organizama, to se najčešće događa prilikom prskanja pesticida. Nekontrolirana uporaba pesticida dovela je do smanjenja broja kopnenih i vodenih životinjskih i biljnih vrsta (Mahmood i sur., 2016). Prema načinu na koji djeluju insekticidi se smatraju najotrovnijim za životinje, dok su fungicidi i herbicidi na popisu toksičnosti drugi i treći po redu (Lackmann i sur., 2018; Mahmood i sur., 2016). Pesticidi ulaze u vodene i terestričke ekosustave na dva različita načina, ovisno o njihovoj topljivosti. Pesticidi topljivi u vodi, otapaju se u vodi i ulaze u podzemne vode, potoke, rijeke i jezera, što uzrokuje štetu za druge organizme (Mahmood i sur., 2016). Pesticidi topljivi u mastima se apsorbiraju u masnim tkivima životinja, što rezultira postojanošću pesticida u hranidbenim lancima u dužem vremenskom razdoblju (Mahmood i sur., 2016). Što je viša trofička razina, to će biti veća koncentracija pesticida, a taj proces poznatiji je kao bioamplifikacija. Pesticidi mogu dospjeti u vodu preko otjecanja, ispiranja tla ili se mogu primijeniti izravno na površinsku vodu. Prekomjernim korištenjem pesticida uočava se opadanje populacija različitih vrsta riba (Scholz i sur., 2012). Atrazin, poznati herbicid, toksičan je za neke vrste riba i posredno utječe na imunološki sustav nekih vodozemaca (Rohr i sur., 2008; Forson i Storfer, 2006). Kemijski spoj glifosat uzrokuje visoku smrtnost punoglavaca i juvenilnih žaba (Relyea, 2005).

Jedna od glavnih briga prekomjerne upotrebe pesticida je njihovo ispiranje u tlo, što utječe na floru i faunu koja živi u tlu. Tlo je složena povezanost između živih organizama, mineralnih čestica, organske tvari, vode i zraka. Frakcija glinenih minerala i humus organske tvari su koloidi (promjer <0.002 mm), koji zbog svoje male veličine imaju veliku površinu po jedinici volumena. Kada organski spojevi uđu u tlo, oni se raspodjele između vode u tlu, zraka u tlu i dostupnih površina na mineralima tla i organskoj tvari (Walker i sur., 2016). Fauna tla dijeli se na megafaunu (kralježnjaci, pr. krlice (Talpidae), makrofaunu (pr. Lumbricidae (i druge porodice gujavica), puževi (Gastropoda), jednakonošci (Isopoda), dvojenoge (Diplopoda), kukci (ličinke)), mezofaunu (pr. grinje (Acari), skokuni (Collembola), enhitreide (Enchytraeidae) i mikrofaunu (pr. bičaši

(Flagellata), oblići (Nematoda)). Živi svijet u tlu i na tlu, vrlo je važan za sve procese koji se tamo odvijaju. Populacije korisnih kukaca, kao što su pčele, mogu značajno opasti upotrebom insekticida poput karbamata, organofosfata i piretroida (Pilling i Jepson, 1993). Dokazano je da klorotalonil i dinitrofenil, fungicidi narušavaju procese nitrifikacije i denitrifikacije ovisne o bakterijama (Man i Zucong, 2009). Glifosat smanjuje rast i aktivnost bakterija koje fiksiraju dušik u tlu (Santos i Flores, 1995). Neonikotinoidi se akumuliraju u tlu i uzrokuju smrtnost gujavica (Goulson, 2013). Fungicidi mogu neizravno smanjiti populacije ptica i sisavaca, uništavajući gujavice koje su izvor hrane (Mahmood i sur., 2016). Utjecaj poljoprivrednih dodataka na organizme u tlu može se izmjeriti kao promjena u količini pojedinih organizama, skupina organizama ili metodološki definiranih skupina, promjena u biološkoj aktivnosti, npr. respiracija tla i aktivnosti enzima (Bünemann i sur., 2006).

1.2. Gujavice

1.2.1. Biologija i ekologija gujavica

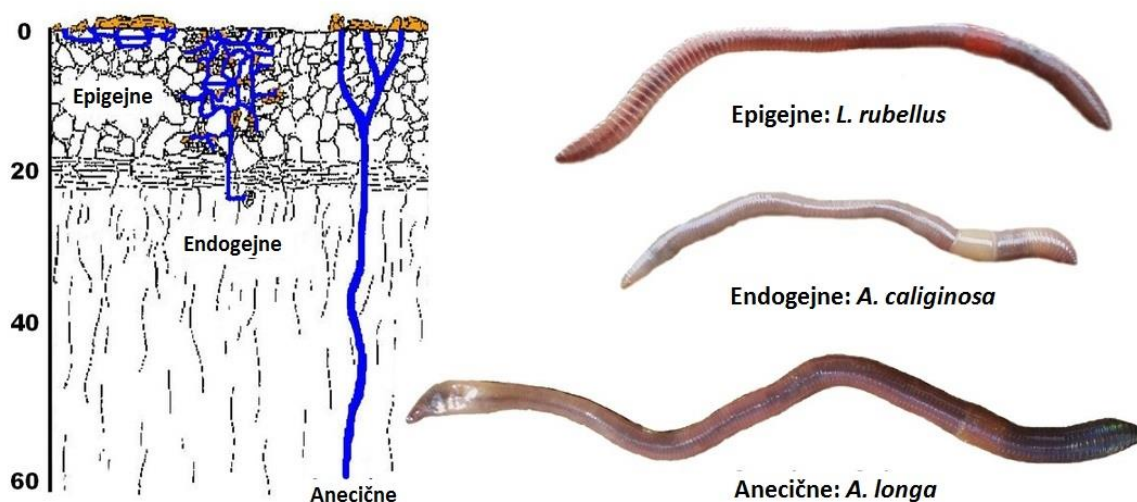
Gujavice pripadaju koljenu Annelida (kolutićavci), razredu Clitellata (pojasnici) te podrazredu Oligochaeta (maločetinaši) (Habdija i sur., 2011). Bilateralno simetrične su građe, a tijelo im je segmentirano, s jasno izraženim kolutićima izvana i iznutra. Tijelo izvana obavija tanka, pigmentirana epiderma, ispod koje se nalazi vanjski sloj prstenastih i unutarnji sloj uzdužnih mišića. Svaki kolutić, osim usnog i analnog ima čekinje koje pomažu pri kretanju, zajedno s mišićima. Tjelesna šupljina je celom (celomska šupljina), a smještena je između mišića i probavila. Celomska šupljina ispunjena je celomskom tekućinom koja ima funkciju hidroskeleta i služi kao oslonac prstenastim i uzdužnim mišićima. Gujavice su dvospolci, imaju vanjsku oplodnju koja se događa nakon spolnog sazrijevanja, tako što se iz zadebljanog dijela epiderme, pojasa (engl. *clitellum*) izlučuje kokon u kojem se razvija zametak. Probava gujavica je ekstracelularna, optjecajni sustav je zatvoren, a disanje se odvija preko kože. Ekskrecijski sustav čine protonefridij i metanefridij. Imaju ljestvičast živčani sustav, a na osjetnim krajevima iznad kutikule sadrže kemoreceptorne stanice koje čine osjetilni sustav. Tijelo gujavica čini 85% vode, stoga je očuvanje vode izrazito važno jer tanka kutikula i sluzni premaz ne pružaju dovoljnu zaštitu od isušivanja (Dominguez, 2004; Edwards i Bohlen, 1996).

S obzirom na način života i karakteristike životnog ciklusa, gujavice se mogu podjeliti na tri ekološke kategorije prema Bouché (1977) i Lee (1985) (Slika 2):

Epigejne vrste: nalaze se iznad mineralnog sloja tla, a ispod biljnih ostataka ili druge organske tvari. Takve vrste su pigmentirane, manje veličine, vrlo pokretne, imaju kratke životne cikluse. Hrane se biljnim ostacima i drugom organskom tvari. Najpoznatiji predstavnici su *Eisenia fetida*, *Dendrobaena octaedra* i *Lumbricus rubellus*.

Anecične vrste: žive u trajnim vertikalnim hodnicima u mineralnom sloju tla, do 3 m dubine. Vrste ove skupine su velike, na dorzalnoj strani tijela su tamno pigmentirane. Životni vijek im je relativno dug, u usporedbi s drugim životnim ciklusima. Hrane se lišćem s površine tla. Najpoznatiji predstavnici su *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea longa*.

Endogejne vrste: žive u plitkim, horizontalnim hodnicima u tlu, koji nisu stalni. Mogu biti različitih veličina, većinom su nepigmentirane i sporo se kreću. Trajenje životnog ciklusa im je između epigejnih i anecičnih gujavica. Najpoznatiji predstavnici su *Aporrectodea rosea*, *Aporrectodea caliginosa* i *Octolasion lacteum*.



Slika 2. Morfo-ekološke kategorije gujavica (Web 2).

1.2.2. Uloga gujavica u tlu

Gujavice predstavljaju najveću količinu biomase u tlu umjerenih ekosustava i imaju važnu ulogu u funkcioniranju tla. Kao inženjeri ekosustava (Jones i sur., 1994) utječu na dinamiku organske tvari, strukturu tla i mikrobne zajednice (Fragoso i sur., 1997; Edwards i Bohlen 1996). Aktivno sudjeluju u aeraciji tla, infiltraciji vode i mješanju horizonta tla, te predstavljaju važan izvor hrane za mnoge druge organizme, kao što su ptice ili krtice (Lavelle i sur., 2006; Edwards i Bohlen, 1996). Formiranje tla je dugotrajan proces koji uključuje razgradnju primarnih minerala i ugradnju organske tvari (Blouin i sur., 2013). Darwin (1881) je bio među prvima koji uvrštavaju i žive organizme na popis faktora odgovornih za formiranje tla, osobito gujavice kroz procese mješanja tla. Jedna od najvažnijih uloga gujavica u tlu je kontrola stope humifikacije putem aktivnosti hranjenja, ukopavanja (engl. *burrowing*) i interakcije s mikroorganizmima (Bernier, 1998). Osim što pridonose formiranju humusa, gujavice zakopavaju organsku tvar s površine i jednako tako donose čestice tla iz dubljih horizonta tla na površinu (Blouin i sur., 2013). Mogu potaknuti rast biljaka, poboljšavajući plodnost tla, kruženje hranjivih tvari (Lee, 1985), modificirajući poroznost i agregaciju tla čime se poboljšava dostupnost vode i kisika biljkama (Allaire-Leung i sur., 2000), stimulirajući proizvodnju regulatora rasta biljaka putem poticanja mikrobne aktivnosti (Quaggiotti i sur., 2004; Nardi i sur., 2002).

1.2.3. Gujavice kao modelni organizam u ekotoksikološkim istraživanjima

U ekotoksikološkim istraživanjima tla razmatraju se negativni učinci zagađivala na komponente ekološkog sustava tla (Velki, 2014). U ekotoksikologiji tla modelne vrste su obično one koje se lako održavaju i uzgajaju u laboratorijskim uvjetima. Najčešće korišteni modelni organizmi od beskralježnjaka su gujavice, enhitreide i skokuni (Römbke i sur., 1996; Edwards i sur., 1995; Edwards, 1989). Još 1984. godine, Callahan (1984) je naglasio važnost gujavica za procjenu općeg utjecaja onečišćenja tla. Od tada se gujavice koriste kao bioindikator za kakvoću tla i utjecaj zagađivala na okoliš (Cortet i sur., 1999; Paoletti, 1999). Većina gujavica se može lako prikupiti, uzgajati i determinirati, pa su prihvaćene kao vrste za proučavanje utjecaja vanjskih zagađivala na okoliš, kao što su pesticidi, ugljikovodici, teški metali i drugi (Edwards i Bohlen, 1996). Odgovor gujavica na prisutnost pesticida može se mjeriti na infra-individualnoj razini (npr. ekspresija gena,

enzimska aktivnost), individualnoj razini (npr. preživljavanje, razmnožavanje i ponašanje) te na razini zajednice (npr. raznolikost i struktura zajednice) (Pelosi i sur., 2014).

Za proučavanje utjecaja pesticida na gujavice koriste se različite metode. U standardizirane testove ubrajamo testove akutne toksičnosti (ISO, 1993; OECD, 1984) i testove reprodukcije (OECD, 2004; ISO, 1998). U testovima akutne toksičnosti uobičajeno se koriste kontaktni filter papir testovi (48-72 h), gdje su gujavice izložene pesticidu dermalno, preko polupropusne kutikule, ali takvim testovima mogu se mjeriti samo kratkoročni učinci (OECD, 1984; Edwards, 1983). Druga vrsta testova akutne toksičnosti su laboratorijska ispitivanja tla s umjetnim ili prirodnim tlima (Edwards i Bohlen, 1996). Kontaktni filter papir testovi koriste se za mjerenje infra-individualnih i individualnih parametara. Rezultati takvih testova se većinom razlikuju od onih dobivenih ispitivanjem u tlu (Heimbach, 1984). U testu s umjetnim tлом (14 dana), tlo se miješa s pesticidom u svrhu dobivanja homogene smjese te su gujavice izložene pesticidu dermalnim putem, ali i kroz probavni sustav (ISO, 1993; OECD, 1984). Modelne vrste korištene u većini toksikoloških istraživanja su uglavnom iz roda *Eisenia* (Sanchez-Hernandez, 2006), iako se vrste iz roda *Lumbricus* sve više proučavaju (Morgan i sur., 2007). Test OECD (1984) na gujavicama je najbolje uspostavljeni standard te je dostigao stupanj zakonske obveze u nekim zemljama, prije nego što se nove kemikalije primjene u okoliš. Prema OECD standardu preporučene vrste za toksikološke testove su *Eisenia fetida* i *Eisenia andrei*. *Eisenia fetida*, najčešće korištena vrsta, lako se kultivira u laboratoriju i ima reproduktivni ciklus od oko 6 tjedana na 20 °C. Ponašanje gujavica u tlu važno je za unos zagađivala (Jager, 1998.), pa različite strategije hranjenja mogu utjecati na onečišćujuće tvari prisutne u okolišu. *E. andrei* živi na mjestima bogatim organskom tvari i trulom vegetacijom (Sims i Gerard, 1985), stoga bi ova vrsta bila izložena različitim koncentracijama onečišćujućih tvari u okolišu u odnosu na druge vrste gujavica koje se hrane tлом ili žive dublje u tlu. Različite vrste gujavica imaju različitu osjetljivost na pesticide, te se to mora uzeti u obzir u interpretaciji rezultata. *Eisenia fetida* je u prosjeku manje osjetljiva na pesticide od vrsta prisutnih u kultiviranim poljima (Pelosi i sur., 2014.). U istraživanju Lukkari i sur. (2005), epigejna vrsta *E. fetida* tolerantnija je prema metalima i ima sposobnost regulirati koncentracije metala u tkivima, za razliku od endogejne vrste *Aporrectodea tuberculata*. Ma i Bodt (1993) su utvrdili da je *Aporrectodea caliginosa* osjetljivija na klorpirifos od vrsta iz roda *Eisenia*, a da su vrste iz roda *Lumbricus* najosjetljivije. Pojava smrtnosti kod *Lumbricus rubellus* i *Lumbricus terrestris* nakon izloženosti organofosfatima ukazuje na

veću osjetljivost ovih vrsta gujavica u usporedbi s vrstama *Eisenia andrei* i *Octolasion lacteum* (Velki i sur., 2014). Velki i Hackenberger (2013a) su otkrili da je *E. andrei* manje osjetljiva vrsta u usporedbi s *L. rubellus*. U istraživanju Velki i Hackenberger (2012) usporedba odgovora između *E. andrei* i *O. lacteum* pokazala je značajne razlike između te dvije vrste, a pokazalo se da je *E. andrei* manje osjetljiva na izlaganje dimetoatu od *O. lacteum*. Robidoux i sur. (2004) dokazali su da epigejna vrsta *E. andrei* može tolerirati veće koncentracije 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) u mezokozmosu, za razliku od autohtone endogejne vrste *A. rosea*. Upotreba vrsta samo iz roda *Eisenia* u standardnim toksikološkim ispitivanjima pesticida (i drugih onečišćujućih tvari) može imati ozbiljne posljedice jer dobiveni rezultati tih ispitivanja mogu podcijeniti toksičnost pesticida na druge vrste gujavica prisutnih u realnom okruženju (Velki i Hackenberger, 2013a). Istraživanja se često provode na vrstama iz iste ekološke kategorije, tako da je i dalje teško predvidjeti učinak pesticida na zajednice gujavica koje obuhvaćaju epigejne, endogejne i anecične gujavice.

1.2.4. Istraživanja utjecaja pesticida na gujavice

Posljednjih godina provedena su brojna ispitivanja učinaka pesticida na neciljne vrste, uključujući gujavice, za određeni broj pesticida. Utvrđeno je da pesticidi utječu na gujavice tako što uzrokuju promjene u ponašanju, izmjene u ekspresiji gena, utječu na funkcioniranje enzima, povećavaju smrtnost, utječu na rast, plodnost i reprodukciju (Liu i sur., 2018; Velki i sur., 2014; Zhang i sur., 2013).

Koncentracija pesticida je veća u površinskim slojevima, pa je zabilježena znatno smanjena aktivnost gujavica u površinskom sloju tla (Cook i sur., 1980). Insekticidi i fungicidi imaju neurotoksične učinke u gujavicama i nakon dugotrajne izloženosti uzrokuju fiziološka oštećenja (Schreck i sur., 2008). Insekticid klorpirifos ima štetne učinke na gujavice na staničnoj razini uzrokujući oštećenja DNA (Casabé i sur., 2007). Herbicidi općenito pokazuju nisku toksičnost prema gujavicama, iako postoje iznimke (Zarea, 2010). Utječu na hranjenje gujavica, što se odrazilo na gubitak težine i reproduktivnu sposobnost, te smanjenu proizvodnju kokona (Bustos-Obregon i Goicochea, 2002). Glifosat utječe na aktivnost hranjenja i preživljavanje gujavica (Casabé i sur., 2007). Rast i proizvodnja kokona drastično se smanjuje kod vrste *Eisenia fetida* koja je izložena subletalnim koncentracijama atrazina (Fisher, 1989). Smanjen je rast, proizvodnja

kokona i razvoj pojasa u vrsti *Eisenia fetida* izloženoj butakloru (Stojanović i sur., 2007). Butaklor, također ima učinak na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u gujavicama (Bünemann i sur., 2006). Smrtnost gujavica također ovisi o vremenu izlaganja herbicidu. Xiao i sur. (2004), utvrdili su da je smrtnost gujavica povećana, s povećanim vremenom izlaganja bilo kojoj danoj koncentraciji acetoklora. Utvrđeno je da se srednja biomasa gujavica smanjuje, s povećanjem koncentracije herbicida. Koncentracije atrazina (>40 µg/L) u kombinaciji s klorpirifosom, metil-parationom i diazinonom, uzrokovale su značajno povećanje smrtnosti gujavica vrste *E. fetida* (Lydy i Linck, 2003). Istraživanja su pokazala da triazinski herbicidi imaju toksične učinke na populacije *E. fetida* (Lydy i Linck, 2003; Fisher, 1989). Zabilježeno je da su gujavice izbjegavale tlo kontaminirano herbicidom fenmedifamom (Amorim i sur., 2005). Giulio i sur. (1989), otkrili su da 1-metil-3-oktil imidazolijev bromid dovodi do oksidativnog stresa u gujavicama. Ostali učinci herbicida na organizme u tlu, uglavnom se očituju u promjenama aktivnosti različitih enzima (Bünemann i sur., 2006).

1.3. Istraživani pesticid

U ovom radu korišten je Koban T, komercijalni pripravak herbicida koji se sastojao od dvije aktivne tvari (Tablica 1). Koban T je kombinirani zemljišni herbicid za suzbijanje jednogodišnjih uskolisnih korova: običnog koštana, muharika, obične svračice i divljeg prosa te jednogodišnjih širokolisnih korova: šćira, bijele lobode, pelinolosne ambrozije, velikog dvornika i dr., u kukuruzu za zrno i silažu (Web 3).

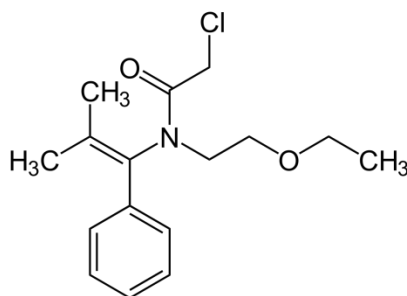
Tablica 1. Kombinirani pripravak korišten u radu.

| Komercijalni pripravak | Aktivni sastojci | Koncentracija aktivnog sastojka | Vrsta spoja |
|--|------------------|---------------------------------|--|
| KOBAN® T (Agro chem d.o.o, Zagreb) | petoksamid | 300 g/L | Herbicid (kloroacetamid) |
| | terbutilazin | 250 g/L | Herbicid, mikrobiocid, algicid (triazin) |

1.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva petoksamida

Petoksamid (2-kloro-N-(2-etoksietil)-N-(2-metil-1-fenil-1-propenil)acetamid) je kloroacetamidni herbicid koji se koristi prije nicanja i odmah nakon nicanja, u svrhu suzbijanja određenih korova u kukuruzu, soji, suncokretu i drugim usjevima. To je sustavni herbicid koji apsorbira korijen i mladi izdanci, inhibirajući diobu stanica. Njegova disipacija u tlu određena u laboratoriju (vrijeme poluraspada (DT50)=5.5–8.1 dana) i na polju (DT50=7.3–22.2 dana) je brza, a njegova razgradnja u tlu proizvodi petoksamid sulfonsku kiselinu (N-(2-etoksietil)-N-(2-metil-1-fenil-1-propenil)-2-sulfoacetamid), kao glavni metabolit (PPDB, 2018). Sudbina ovog spoja u tlu i njegov utjecaj na okoliš, proučavani su od kada je uveden na tržište 2002. godine, ali i dalje je potrebno istraživati utjecaj različitih čimbenika na disipaciju petoksamida i njegov utjecaj na mikrobnu zajednicu tla (Rodríguez-Cruz i sur., 2019). Toksičnost petoksamida za ptice i sisavce je mala. Ispitivanja akutne toksičnosti, pokazuju nisku akutnu toksičnost za gujavice (Web 4).

Strukturna formula:



Kemijski naziv prema IUPAC-u: 2-kloro-N-(2-etoksietil)-N-(2-metil-1-fenilprop-1-enil)acetamid

Kemijska formula: $C_{16}H_{22}ClNO_2$

CAS registarski broj: 106700-29-2

Molarna masa: 295.8 g/mol

Fizikalno stanje: bijeli prah

Gustoća: 1.147 g/cm³

Topivost u vodi: 0.4 g/L (20 °C)

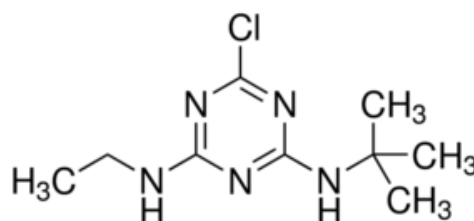
Topivost u drugim otapalima: topiv u acetonu, 1,2-dikloroetanu, etil acetatu, metanolu, heksanu, ksilenu i heptanu

Talište: 37 °C

1.3.2. Fizikalno-kemijska svojstva terbutilazina

Klorirani s-triazini su široko korišteni herbicidi za kontrolu prije i nakon nicanja korova (Sokolová i sur., 2003). Triazini su herbicidi koji se najviše koriste u svijetu za selektivno suzbijanje korova u usjevima. S-triazinski herbicidi (karakterizirani simetričnim heksamernim prstenom koji se sastoji od izmjeničnog ugljika i dušika) i dušična gnojiva često se javljaju kao onečišćivači podzemnih voda (Caracciolo i sur., 2005). Terbutilazin (TBA, 2-klor-4-terc-butilamino-6-etilamino-s-triazin) pripada triazinskim herbicidima, zamjenjuje rašireni atrazin u nekoliko regija (u Njemačkoj, Italiji i drugim zemljama, od zabrane atrazina u travnju 1991.) (Lorenz i sur., 1996). U tlu se zadržava duže od atrazina te je stabilniji, pa služi kao alternativa u izboru zemljišnih pripravaka za kukuruz. Mehanizam djelovanja i ciljna mjesta djelovanja istovjetna su atrazinu (Lorenz i sur., 1996). Herbicidno djelovanje terbutilazina temelji se na inhibiciji lančanih reakcija prijenosa elektrona u fotosustavu II. Produkti nastali redukcijom triazina uključuju deklorirane i desetilirane derivate (Sokolová i sur., 2003). Široka upotreba terbutilazina rezultirala je širokom kontaminacijom podzemnih i površinskih voda (Fingler i sur., 2017). Mjerenja provedena na podzemnim vodama pokazuju da se terbutilazin često pojavljuje u koncentracijama iznad dozvoljene granice od 0.1 mg/L (Caracciolo i sur., 2005). Pokazalo se da je terbutilazin vrlo toksičan za vodene organizme, uzrokujući morfološke promjene ovisne o dozi te oštećenje škrge, crijeva i bubrega riba, kao i poremećaje u biokemijskim parametrima i oksidativni stres u šaranu (Lovaković i sur., 2017).

Strukturna formula:



Kemijski naziv prema IUPAC-u: 2-N-terc-butil-6-kloro-4-N-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin

Kemijska formula: $C_9H_{16}ClN_5$

CAS registarski broj: 5915-41-3

Molarna masa: 229.71 g/mol

Fizikalno stanje: bijeli prah

Gustoća: 1.122 g/cm^3

Topivost u vodi: 5.0 mg/L na 20 °C

Topivost u drugim otapalima: topiv u acetonu, etanolu, oktanolu, heksanu, dimetilformamidu, etil acetatu, izopropanolu, tetralinu, toluenu, etilen glikolu

Talište: 178 °C

1.3.3. Dosadašnja istraživanja toksičnih učinaka petoksamida i terbutilazina na gujavice

U radu Velki i sur. (2019), ispitan je utjecaj osam različitih pesticida, uključujući kombinirani herbicid Koban T (300 g/L petoksamid + 50 g/L terbutilazin) na vrstu *Eisenia andrei*. Cilj istraživanja bio je utvrditi i usporediti akutnu toksičnost pesticida na gujavice te procijeniti učinak na aktivnost transmembranskih crpki za izbacivanje ksenobiotika (MXR) i ekspresiju gena. Gujavice su bile izložene pesticidima pomoću kontaktnog filter papir testa, te je prema rezultatima letalnih koncentracija (LC50), nakon 48 h, Koban T klasificiran kao izrazito toksičan herbicid za vrstu *E. andrei*. Najjači učinak pesticida na MXR aktivnost nakon 48 h izlaganja, zabilježen je nakon izlaganja Kobanu T gdje je porast koncentracije rodamina B (RB) bio tri puta veći od kontrole. Koban T, također je uzrokovao značajno povećanje ekspresije gena *cat*, *sod*, i *gst*, 48 h nakon izlaganja pesticidu. Osim navedenog istraživanja (Velki i sur., 2019) nema zabilježenih prethodnih istraživanja procjene toksičnosti petoksamida na gujavice ili kombinacije petoksamida s terbutilazinom.

Brunninger i sur. (1994) u svom radu su istražili učinke subletalnih koncentracija terbutilazina i karbofurana na rast i razmnožavanje vrste *Eisenia andrei* tijekom tri generacije. Pesticidi su aplicirani na hranu gujavica, te je uočeno značajno smanjenje proizvodnje kokona. Redukcija je postala izraženija s povećanjem trajanja izloženosti pesticidu. Gujavice su nakon 5 mjeseci tretiranja pesticidom, prestale proizvoditi kokone (Brunninger i sur., 1994). U radu Viswanathan (1997) vrste *Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida* i *Eisenia andrei* su izlagane terbutilazinu te su zapaženi učinci na disanje i ekskreciju gujavica. Utjecaj na dobivene rezultate respiracije i izlučivanja amonijaka i uree imao je brži metabolizam u vrsti *E. andrei*, u odnosu na *L. terrestris*, te im je to omogućilo da se bolje nose u slučaju izloženosti pesticidu. U istraživanju Tejeda i sur. (2013) otkriveno je smanjenje težine i inhibicija aktivnosti glutation-S transferaze kod vrsta *Eisenia fetida* i *Lumbricus terrestris*, prilikom povećanja koncentracije terbutilazina u tretiranim tlima. Za terbutilazin određena je LC50 korištenjem testa s umjetnim tlom i vrstom *E. fetida*, i iznosi 1.26 mg/kg (Milanović i sur., 2014).

1.4. Biomarkeri

Biomarkeri ili biološki biljezi mogu se definirati kao „bilo koji biološki odgovor na kemijsku tvar iz okoliša na individualnoj razini koji pokazuje odstupanje od normalnih uvjeta" (Walker i sur., 2016). Dakle, biokemijska, fiziološka, histološka, morfološka mjerenja i mjerenja ponašanja, smatraju se biomarkerima. Biološki odgovori na višim organizacijskim razinama-stanovništvo, zajednica i ekosustav, smatraju se bioindikatorima (Walker i sur., 2016). Predloženo je niz klasifikacija biomarkera, a najčešće se koristi podjela na biomarkere izloženosti, biomarkere učinka i biomarkere osjetljivosti (WHO, 1993). Biomarkeri izloženosti ukazuju na izloženost organizma kemijskim zagađivačima, ali ne daju informacije o štetnim učincima koje takva promjena izaziva. Biomarkeri učinka pokazuju štetne promjene u organizmu uključujući biokemijske, fiziološke i druge promjene unutar organizma (Walker i sur., 2016). Biomarkeri osjetljivosti usredotočeni su na genetske predispozicije u organizmu prilikom izloženosti ksenobiotiku (WHO, 1993). Najvažniji razlog korištenja biomarkera u procjeni rizika za okoliš je taj što biomarkeri mogu dati informacije o učincima onečišćujućih tvari, dopuna su biomonitoringu koji uključuje utvrđivanje razina zagađivala u okolišu. Korištenje biomarkera od velikog je značaja za procjenu rizika onečišćenja okoliša jer promjene otkrivene na nižim razinama

biološke organizacije, mogu poslužiti kao rani pokazatelji mogućih učinaka na višim razinama biološke organizacije (Spurgeon i sur., 2005).

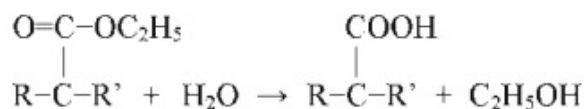
1.4.1. Test izbjegavanja

Ograničenja, kao što su nemogućnost procjene učinaka na populacije gujavica testovima akutne toksičnosti i dugo trajanje (56 dana) reproduksijskih testova, zahtjevala su metode brze procjene s kraćim trajanjem i visokom osjetljivošću. Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. „*International Organization for Standardization*“, ISO), izradila je smjernice za određivanje funkcija staništa tla testom izbjegavanja (ISO, 2008). Test izbjegavanja ubraja se u biomarkere ponašanja. Ovaj jednostavan test dizajniran je kako bi otkrio značajno odbijanje onečišćenog odjeljka pesticidom, u usporedbi s kontrolnim odjeljkom. To podrazumijeva da gujavice imaju sposobnost otkriti toksične spojeve i „pobjeći“ od njih (Pelosi i sur., 2014). Ovo je najčešći test ponašanja za gujavice jer je vrlo jednostavan i isplativ, relativno kratko traje, što ga čini idealnim za brzu procjenu onečišćenja tla (De Silva i Amarasinghe, 2008). Test izbjegavanja je test koji se koristi u procjeni rizika tla (Stephenson i sur., 1998), i pokazalo se da je osjetljivost testa jednaka kao i kod testa reprodukcije (Hund-Rinke i sur., 2003). U testovima gujavice koriste prisutne kemoreceptore na anteriornim segmentima koji mogu otkriti širok raspon zagađivala (Reinecke i sur., 2002). Smatra se da se funkcija tla smanjuje, ako se u kontrolnom tlu u usporedbi s onečišćenim tlom nalazi više od 80% gujavica, stoga je test izbjegavanja ekološki vrlo značajan (Yang i sur., 2018). U nekim je slučajevima primijećena značajna privlačnost gujavica onečišćenim tlima (De Silva i van Gestel, 2009). Provedeni su opsežni testovi izbjegavanja posljednjih godina, ali većina njih se usredotočila na pojedinačne učinke toksičnih tvari (Brami i sur., 2017; Scheffczyk i sur., 2014), dok kombinirani učinci smjesa toksičnih tvari na gujavice, uglavnom nisu objašnjeni (Uwizeyimana i sur., 2017).

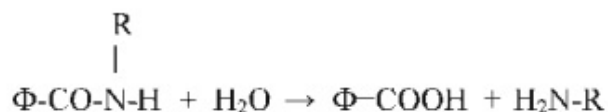
1.4.2. Karboksilesteraza (CES)

Karboksilesteraza pripada biomarkerima I faze metabolizma ksenobiotika. Enzimi faze I kataliziraju reakciju pretvorbe koja se naziva funkcionalizacija, za lipofilni strani spoj, gdje se funkcionalna skupina uvodi u njegovu kemijsku strukturu reakcijama poput

oksidacije, hidrolize ili redukcije. Funkcionalizacija povećava polaritet lipofilnog stranog spoja, čineći ga spremnim za sljedeći metabolički korak (Chen, 2011). Modificirani spoj često dovodi do stvaranja aktivnog metaboličkog međuprodukta. U hidrolitičke enzime (hidrolaze) ubrajaju se karboksilesteraze i epoksidne hidrolaze. Karboksilesteraze se nalaze u endoplazmatskom retikulumu i u citosolu stanica. Ovi enzimi uključeni su u metaboličku aktivaciju različitih lijekova i ostalih ksenobiotika. Izozimi karboksilesteraze, karboksilesteraza 1 i karboksilesteraza 2 pripadaju obitelji hidrolaza (Chen, 2011). Ove dvije izoforme sudjeluju u hidrolizi estera i amida, posebno djelujući na karboksilne esterske veze. Karboksilesteraze kataliziraju reakciju hidrolize karboksilnih estera, čime nastaju alkohol i karboksilat (Chen, 2011):



Hidrolizom karboksilnog amida dobiva se N-hidroksid i karboksilat:

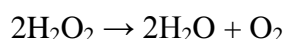


Reakcije koje uzrokuju karboksilesteraze ne vode uvijek do procesa detoksifikacije jer se neki ksenobiotici pretvaraju u kemijski aktivne metabolite (Chen, 2011). Enzimi koji detoksificiraju pesticide, poput karboksilesteraza mogu učiniti pesticid neučinkovitim za pojedince koji prirodno imaju visoku razinu takvih enzima (Stenersen, 2004). CES detoksificiraju organofosphate (OP) i karbamate (CB) i sintetičke piretroide (SP) na dva glavna načina: hidrolizom esterske veze i vezanjem pesticida (OP) na aktivno mjesto enzima (Wheelock i sur., 2005). Karboksilesteraze su opisane kod gujavica. Crijevni trakt *Lumbricus terrestris* predstavlja široku paletu enzima, a među njima prevladava aktivnost CES u perifernom kolragogenom tkivu (Prento, 1987). Sanchez-Hernandez i Wheelock (2009) utvrdili su dvanaest izozima CES u gastrointestinalnom traktu, mišićima tijela i reproduktivnim tkivima *L. terrestris*.

1.4.3. Katalaza (CAT)

Slobodni radikali kisika i dušika neophodni su u fiziološkoj kontroli stanične funkcije u biološkim sustavima i kontinuirano se stvaraju u živim stanicama. Poremećaj u ravnoteži između stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i antioksidativne obrane očituje se kao oksidativni stres (Naito i sur., 2010). Uz korištenje primarnih i sekundarnih produkata štetnih slobodnih radikala, biomarkeri mogu pratiti status različitih antioksidativnih obrambenih mehanizama protiv slobodnih radikala. U enzimске antioksidanse ubrajaju se enzimi kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GSH), glutation-reduktaza (GR) i katalaza (Valavanidis i sur., 2006).

Katalaza (CAT) je jedan od esencijalnih enzima u procesu detoksifikacije ROS-a. Promjena aktivnosti CAT pokazatelj je stanične lezije nakon izlaganja kemijskim tvarima, pa se u većini slučajeva smatra ranim biomarkerom za oksidativni stres (Gao i sur., 2008). Glavna funkcija katalaze je razgradnja vodikovog peroksida na vodu i kisik:



CAT je tetramerni protein veličine 244 kDa koji sadrži četiri identične podjedinice. Svaka podjedinica sadrži 527 aminokiselinskih ostataka, jednu hemsku skupinu i čvrsto vezanu molekulu NADPH (Kodydková i sur., 2014). U eukariotskim stanicama CAT se predominantno nalazi u peroksisomima, a prisutna je i u citosolu i mitohondrijima (Fidaleo, 2010). Labrot i sur. (1996) proučavali su učinke metala *in vitro* i *in vivo* na aktivnost CAT u *E. andrei*, gdje rezultati sugeriraju da je antioksidacijski sustav te vrste zanimljiv za proučavanje kao biomarker. Saint-Denis i sur. (1998) lokalizirali su katalazu u citosolnim frakcijama kod vrste *E. fetida andrei*. Većina istraživanja o aktivnosti CAT usredotočena je na organizme tla izložene pesticidima (Brown i sur., 2004) i teškim metalima (Laszczyca i sur., 2004).

1.4.4. Glutation-reduktaza (GR)

Glutation-reduktazu (GR), kao i katalazu, ubrajamo u biomarkere oksidativnog stresa. GR je flavoprotein, građen od dvije podjedinice koje formiraju aktivno mjesto

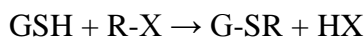
enzima, a svaka od njih ima 4 domene (Tandogan i Ulusu, 2006). Glutation-reduktaza katalizira NADPH-ovisnu redukciju glutacion-disulfida (GSSG) do glutationa (GSH) :



Reakcija je ključna za održavanje razine glutationa. Glutation ima glavnu ulogu kao reducens u procesima redukcije i oksidacije, ponaša se kao antioksidans i sudjeluje u nekoliko drugih staničnih funkcija od velike važnosti. Glutation-reduktaza izolirana je iz različitih organizama te se kod eukariota, uglavnom nalazi u citoplazmi i u organelima, uključujući jezgru i mitohondrije (Carlberg i Mannervik, 1985). Kod gujavica je pronađena uglavnom u citosolu (Saint-Denis i sur., 1998). Porast aktivnosti GR kod gujavica može biti povezan s indukcijom oksidativnog stresa uslijed akumulacije zagađivala (Ečimović i sur., 2018).

1.4.5. Glutation S-transferaza (GST)

Glutation S-transferazu ubrajamo u biomarkere II faze metabolizma ksenobiotika. Enzimi detoksifikacije koji pripadaju fazi II kataliziraju reakcije konjugacije, čineći metabolite manje reaktivnim prema staničnim komponentama, topljivijima u vodi i lakšim za uklanjanje putem urina. U enzime konjugacije faze II ubrajaju se enzimi transferaze, uključujući uridin-difosfat glukuronosil transferaze (UGT), glutation S-transferaze, sulfotransferaze, acetiltransferaze, metiltransferaze i aciltransferaze (Chen, 2011). GST kataliziraju konjugaciju reduciranog glutationa (GSH) sa ksenobiotikom, stvaranjem tioeterske veze između atoma sumpora u GSH i ugljika, ili dušika u elektrofilnom stranom spoju. Konjugat se potom metabolizira kako bi nastao cistein ili N-acetilcistein. Supstrati za GST katalizirane reakcije obično pokazuju hidrofobne i elektrofilne karakteristike. Konjugacija GSH, izuzetno je važan mehanizam u metaboliziranju elektrofilnih stranih spojeva. Elektrofilni su potencijalno toksične vrste jer se mogu vezati za nukleofile poput proteina i nukleinskih kiselina, što dovodi do staničnog oštećenja i genetske mutacije (Chen, 2011). Osnovna reakcija koju katalizira GST je konjugacija GSH sa elektrofilnim supstratima (Sherratt i Hayes, 2001):



Osim detoksifikacijske uloge, GST ima još i transportnu i sintetičku funkciju. GST su prisutne u svim živim organizmima. Eukarioti imaju veći broj citosolnih i membranski vezanih (mitohondriji i endoplazmatski retikulum) GST izoenzima sa različitim specifičnostima za supstrat (Hayes i sur., 2005). Clark i Smith (1975) otkrili su glutation S-transferazu u *Lumbricus rubellus*. Aktivnost glutation S-transferaze dokazana je u šest vrsta gujavica iz porodice Lumbricidae: *Eisenia foetida*, *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, *Allolobophora longa*, *Allolobophora caliginosa* i *Allolobophora chlorotica* (Stenersen i sur., 1979).

1.4.6. Mehanizam multiksenobitičke otpornosti (MXR)

Transmembranske crpke za izbacivanje ksenobiotika ili „efluks“ crpke su transportni proteini uključeni u uklanjanje toksičnih supstrata iz stanica u vanjsko okruženje te mogu biti specifični za jedan supstrat, ili strukturno različite spojeve (Borges-Walmsley i Walmsley, 2001; Saier i Paulsen, 2001). Ovi transmembranski proteini su uključeni u mehanizam multiksenobitičke otpornosti (MXR, engl. *multixenobiotic resistance*), prvi obrambeni mehanizam stanica za uklanjanje toksičnih tvari (Epel, 1998). Izbacivanje štetnih spojeva iz stanice jedna je od najčešće korištenih strategija za rezistenciju na citotoksične lijekove i druge ksenobiotike u prokariotima i eukariotima (Hackenberger i sur., 2012). Efluks proteini su lokalizirani u citoplazmatskoj membrani i djeluju poput crpki, smanjujući unutarstaničnu koncentraciju ksenobiotika do subtoksične razine (Saier i Paulsen, 2001). Efluks crpke nalaze se i u prokariotima i u eukariotima (Van Bambeke i sur., 2003). U prokariotskim organizmima izbacivanje lijekova i drugih citotoksičnih spojeva, uglavnom se događa pomoću crpki u kojima je postupak izbacivanja povezan s ubacivanjem (influksom) protona (H^+) (Ward i sur., 2001; Saier i sur., 1999; Pao i sur., 1998). Za razliku od prokariota, glavni mehanizam efluksa u eukariotima ovisi o proteinima koji dobivaju svoju transportnu energiju iz hidrolize ATP-a (Zgurskaya i Nikaido, 2002; Blackmore i sur., 2001; Nielsen i Skovsgaard, 1992). Mnogi od tih transportera pripadaju ABC (engl. *ATP-binding cassette*) superporodici membranskih transportera. Članovi ove obitelji uključuju P-glikoprotein (P-gp) (Zgurskaya i Nikaido, 2002) i MRP (engl. *multidrug resistance protein*) (Leslie i sur., 2001) crpku. Iako je većina ABC transportera otkrivena u transportu lijekova, oni često imaju širok raspon supstrata. Kako bi se istražile modulacije transmembranskih crpki za izlučivanje ksenobiotika

upotrebljavaju se različite metode koje mjere promjene aktivnosti crpke pomoću akumulacije niza fluorescentnih boja u cijelom organizmu, kao i u izoliranim stanicama i tkivima (Eytan i sur., 1997). Prisutnost transportnih proteina u gujavicama dokazana je akumulacijom široko korištene fluorescentne boje, rodamina B (RB) (Hackenberger i sur., 2012). Efluks crpke mogu izbacivati različita zagađivala iz stanica te tako ograničiti apsorpciju stranih tvari i utjecati na krajnji učinak pojedinačnih kemijskih tvari, kao i smjesa tvari (Hackenberger i sur., 2012). Dakle, praćenje indukcije ili inhibicije ovih crpki može se koristiti kao vrijedan biomarker izloženosti i kao alat za biomonitoring. Budući da se pesticidi često javljaju u staništima gujavica, mogu utjecati na promjene u aktivnosti transmembranskih crpki, a modulacije aktivnosti crpki dovode do promjena u konačnom učinku pesticida. Dokazano je da široki spektar pesticida, uključujući insekticide, herbicide i fungicide uzajamno djeluje s efluks crpkom (Buss i Callaghan, 2008).

1.5. Cilj istraživanja

Do sada je slabo istražen utjecaj mješavine dvije aktivne tvari petoksamida i terbutilazina na populacije gujavica. Glavni cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija kombiniranog herbicida (petoksamid 300 g/L + terbutilazin 250 g/L) na ponašanje gujavica, aktivnost određenih enzima, te na aktivnost MXR primjenom testa s umjetnim tlom.

Ciljevi istraživanja:

- Pomoću testa izbjegavanja utvrditi utjecaj istraživnog herbicida na ponašanje gujavica vrste *Eisenia andrei*.
- U testu s umjetnim tlom utvrditi utjecaj istraživnog herbicida na aktivnost enzima CES, CAT, GR i GST.
- U testu s umjetnim tlom utvrditi utjecaj istraživnog herbicida na aktivnost MXR.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizam

2.1.1. Sistematika i biologija gujavice (*Eisenia andrei*)

| | |
|-------------------|-----------------------|
| Carstvo: | Animalia |
| Koljeno: | Annelida |
| Razred: | Clitellata |
| Podrazred: | Oligochaeta |
| Red: | Haplotaxida |
| Porodica: | Lumbricidae |
| Rod: | <i>Eisenia</i> |
| Vrsta: | <i>Eisenia andrei</i> |



Slika 3. Vrsta *Eisenia andrei*, eksperimentalni organizam (foto: Tea Tunuković)

Eksperimentalna vrsta korištena u ovom istraživanju je *Eisenia andrei*, epigejna vrsta gujavica koja se često koristi u laboratorijskim istraživanjima (Slika 3). Naseljava tla bogata organskim tvarima, ali nije karakteristična za poljoprivredna tla i tla bogata mineralnim tvarima. Ima kratak životni ciklus, izliježe se iz kokona u 3 do 4 dana, a dostiže zrelost u sedam do osam tjedana na 20 °C. Vrlo je plodna vrsta jer svaka gujavica može proizvesti dva do pet kokona tjedno, a iz kokona se izliježe nekoliko gujavica. Komercijalno je dostupna i može se lako uzgajati u širokom rasponu organskih materijala. Kokoni se, također mogu kupiti kako bi se osiguralo korištenje istog soja (OECD, 1984).

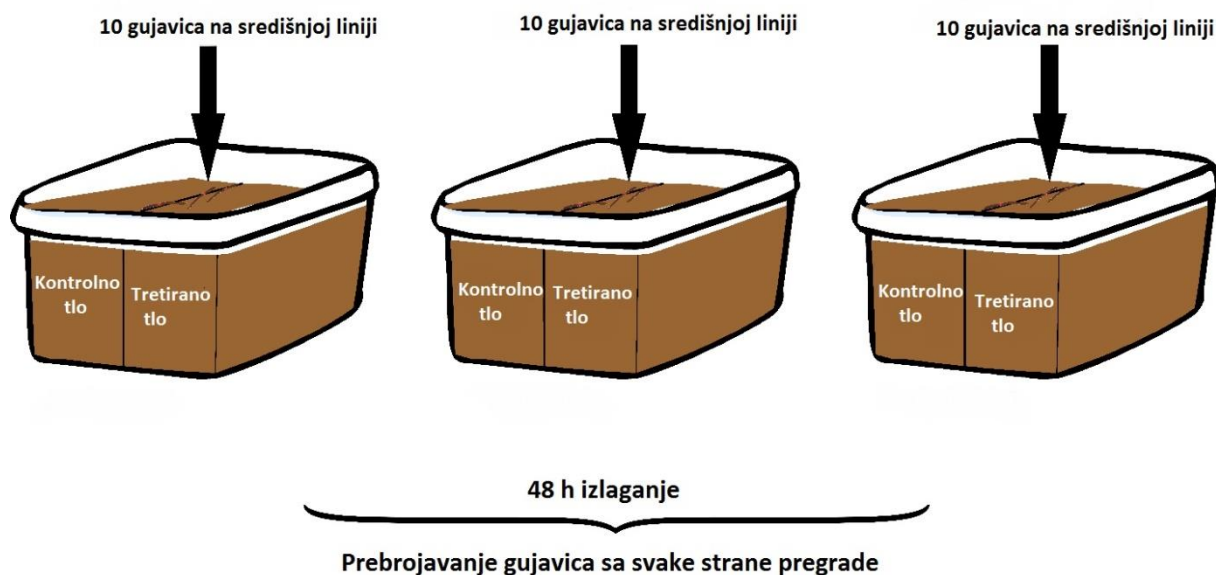
2.1.2. Priprema za eksperimente

Gujavice su nabavljene od lokalnog uzgajivača, a u istraživanju su korištene odrasle, spolno zrele gujavice koje su imale jasno izražen pojas (engl. *clitellum*). Dan prije (24 h) početka eksperimenata, gujavice su stavljene u Petrijevu zdjelicu na prethodno navlažen filter papir, kako bi se probavni trakt gujavica očistio od zemlje. Petrijeva zdjelica bila je prekrivena aluminijskom folijom na kojoj su probušene rupice kako bi

gujavice imale zraka. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice smještene su u tamu, na 20 °C. U svim eksperimentima gujavice su stavljene na čišćenje na isti način.

2.2. Test izbjegavanja

Kako bi se istražilo mogu li gujavice izbjegavati tlo kontaminirano istraživanim pesticidom, proveden je test izbjegavanja (engl. *avoidance test*). U eksperimentu je korišteno tlo LUFA 2.2. Pesticid koji je korišten u svim eksperimentima je Koban T, kombinirani herbicid koji sadrži dvije aktivne tvari – petoksamid (300 g/L) i terbutilazin (250 g/L). Petoksamid je prisutan u većoj koncentraciji pa su prema njemu napravljena razrjeđenja. Koncentracija terbutilazina prisutna je u šest puta nižoj koncentraciji u odnosu na petoksamid. Kako bi se utvrdile koncentracije korištene za test izbjegavanja, provedena su preliminarna ispitivanja mortaliteta u tlu. Utvrđeno je da koncentracija od 100 mg/kg uzrokuje grčenje (spazmove) gujavica i pojavu smrtnosti. Kako je cilj bio istražiti učinke subletalnih koncentracija pesticida, odabrane su koncentracije koje nisu uzrokovale smrtnost, niti morfološke promjene u izloženim gujavicama. Testirane su slijedeće koncentracije istraživanog kombiniranog pripravka pesticida: 1 mg/kg, 5 mg/kg i 10 mg/kg za aktivnu tvar petoksamid, odnosno 0.833 mg/kg, 4.165 mg/kg i 8.33 mg/kg za aktivnu tvar terbutilazin. Test izbjegavanja postavljen je prema metodi opisanoj u De Silva i Amarasinghe (2008). Razrjeđenja pesticida priređena su s destiliranom vodom. U plastične posude (visine 10 cm, dužine 18 cm, širine 16 cm) s 300 g zemlje dodano je 30 mL vode, koja je služila za kontrolu, ili 30 mL otopine pesticida. Nakon miješanja kako bi se postigla homogena raspodjela, posuda je pregrađena na dva dijela - na jednu stranu je stavljeno kontrolno tlo, a na drugu stranu tretirano tlo. Pregrada je uklonjena te je na sredinu posude (na granicu između kontrolnog i tretiranog tla) stavljeno 10 gujavica. Sve istraživane koncentracije, kao i kontrola, priređene su u triplikatu. Posude su zatim stavljene na 20 °C, u tamu, na 48 h. Nakon 48 h tlo se razdvojilo pregradom po sredini, a broj gujavica na svakoj strani određivao se ručnim sortiranjem. Gujavice koje su se nalazile na razdjelnoj liniji, sortirane su ovisno o položaju njihovih glava. Prikaz postavljanja eksperimenta može se vidjeti na Slici 4.



Slika 4. Prikaz postavljanja eksperimenta za test izbjegavanja (preuzeto i prilagođeno prema Lackmann i sur., 2018).

Eksperiment je ponovljen 3 puta (svaki se sastojao od 3 replike za svaku eksperimentalnu skupinu), a odgovor izbjegavanja (%) izračunat je prema slijedećoj jednadžbi (De Silva i Amarasinghe, 2008):

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

Pri čemu je:

A= odgovor na izbjegavanje (%)

C= broj gujavica u kontrolnom tlu

T= broj gujavica u tretiranom tlu

N= ukupan broj izloženih gujavica

2.3. Učinak pesticida na enzimске aktivnosti gujavica

Kako bi se istražio učinak pesticida na aktivnost odabranih enzima, gujavice su izložene pesticidu korištenjem tla LUFA 2.2. Preliminarnim ispitivanjem toksičnosti i na

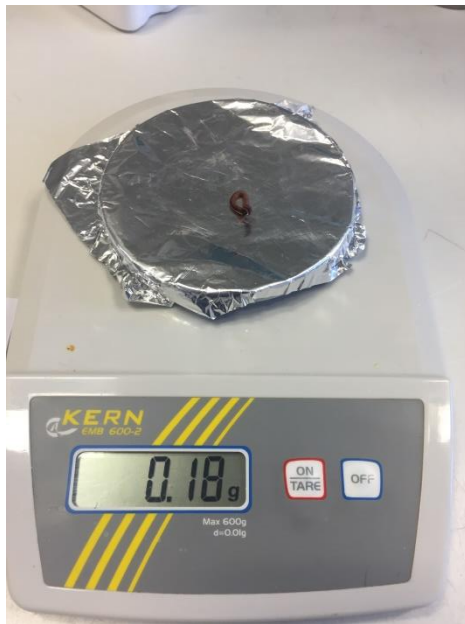
temelju rezultata dobivenih u testu izbjegavanja, određene su koncentracije pesticida za testiranje. Uz koncentracije testirane u testu izbjegavanja, dodana je još jedna koncentracija, 100 puta manja od najveće koncentracije, odnosno 0.1 mg/kg za aktivnu tvar petoksamid (odnosno 0.0833 mg/kg za terbutilazin). Ostale koncentracije za aktivnu tvar petoksamid su 1 mg/kg, 5 mg/kg i 10 mg/kg, odnosno 0.833 mg/kg, 4.165 mg/kg i 8.33 mg/kg za terbutilazin. Razrjeđenja pesticida priređena su s destiliranom vodom. U plastične posude (visine 10 cm, dužine 18 cm, širine 16 cm) s 300 g zemlje dodano je 30 mL vode, koja je služila za kontrolu, ili 30 mL otopine pesticida (Slika 5). Nakon mješanja zemlje u svaku posudu dodano je 10 gujavica. Gujavice su izložene pesticidu 48 h, 7 dana i 14 dana.



Slika 5. Plastična posuda s 300 g tla korištena za eksperiment (foto: Tea Tunuković)

2.3.1. Priprema postmitohondrijske (S9) frakcije

Nakon izlaganja gujavica u trajanju od 48 h, 7 dana i 14 dana, gujavice su izvađene iz tla, pojedinačno izvagane i homogenizirane u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2) u omjeru 1:3 (masa tkiva : volumen pufera) (Slika 6). Homogenat je zatim centrifugiran 30 min na 9000 x g na 4 °C, te je dobiveni supernatant (S9 frakcija) razdijeljen u tri označene epice koje su pohranjene na -80 °C do analize.



Slika 6. Prikaz vaganja gujavice (lijevo) i homogeniziranja s Ultra-Turrax T10 homogenizatorom (desno) (foto: Tea Tunuković)

2.3.2. Određivanje aktivnosti enzima karboksilesteraze (CES)

Aktivnost karboksilesteraze (CES) određena je prema Hosokawa i Satoh (2001). Reakcijska mješavina sadržavala je 190 μL p-nitrofenil acetata (1 mM) i 10 μL uzorka (S9). Kinetika reakcijske smjese praćena je na 405 nm tijekom 2 min, na sobnoj temperaturi. Prati se povećanje apsorbancije na 405 nm, a do porasta dolazi uslijed stvaranja fenola koji je rezultat cijepanja p-nitrofenil acetata uz pomoć CES. Izmjerena je količina proteina u svakom uzorku i izračunata je specifična enzimska aktivnost. Enzimska aktivnost izražena je kao nmol p-nitrofenola proizvedenog u minuti po mg proteina - $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{PROT}}$ (ϵ (za CES) = $16.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

2.3.3. Određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze (CAT) mjerena je metodom prema Claiborne i sur. (1985). Metoda se zasniva na mjerenju razgradnje vodikovog peroksida, odnosno prati se opadanje apsorbancije na 240 nm tijekom 1 min. Mjerenje se vršilo u UV kiveti u koju se dodalo 500 μL fosfatnog pufera (0,1 M, pH 7.2), 15 μL uzorka (S9) i 500 μL H_2O_2 . Odredila se količina proteina u uzorcima i izračunala specifična enzimska aktivnost CAT koja je

izražena kao μmol vodikovog peroksida potrošenog u minuti po mg proteina - $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{PROT}}$ (ϵ (za CAT)= $42.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.3.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation reduktaze (GR)

Aktivnost glutation reduktaze (GR) mjerena je metodom prema Habig i sur. (1974). GR katalizira redukciju glutation-disulfida (GSSG) u sulfhidrilni oblik glutationa (GSH) koristeći NADPH kao redukcijsko sredstvo. Smanjenje GSSG određuje se indirektno mjerenjem potrošnje NADPH, što se pokazuje smanjenjem apsorpcije. U mikropločice se pipetiralo $100 \mu\text{L}$ fosfatnog pufera ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 7.2$), $100 \mu\text{L}$ GSSG, $10 \mu\text{L}$ uzorka (S9) i $10 \mu\text{L}$ NADPH, te je promjena u apsorbanci praćena tijekom 5 min na 340 nm . Odredila se količina proteina u uzorcima i izračunala specifična enzimska aktivnost GR koja je izražena kao nmol reduciranog GSSG u minuti po mg proteina - $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{PROT}}$ (ϵ (za GR)= $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

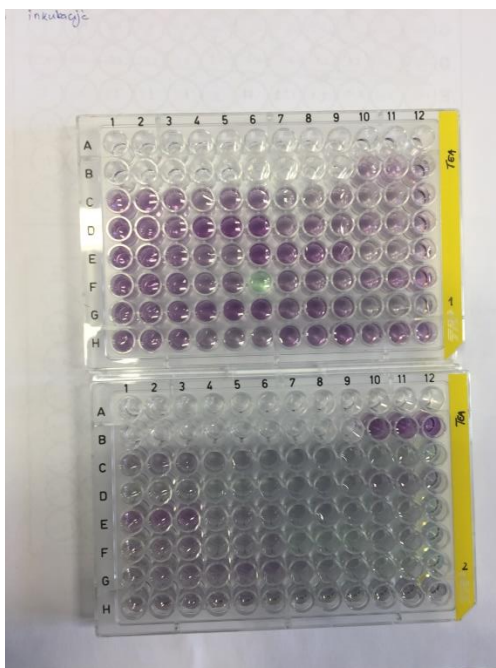
2.3.5. Određivanje aktivnosti enzima glutation S-transferaze (GST)

Aktivnost glutation S-transferaze (GST) mjerena je metodom prema Habig i sur. (1974). Princip metode zasniva se na sljedećem: GST katalizira konjugaciju L-glutaciona sa 1-kloro2,4-dinitrobenzenom (CDNB) kroz tiolnu skupinu L-glutaciona. Brzina porasta apsorbanције direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku. Mjerenje se vršilo u mikropločicama na 340 nm tijekom 2 min , a reakcijska smjesa se sastojala od $160 \mu\text{L}$ CDNB, $7.5 \mu\text{L}$ uzorka (S9) i $40 \mu\text{L}$ GSH. Izmjerena je količina proteina u svakom uzorku i izračunata je specifična enzimska aktivnost GST koja je izražena kao nmol konjugiranog GSH u minuti po mg proteina - $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{PROT}}$ (ϵ (za GST)= $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.3.6. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Ukupna koncentracija proteina određena je pomoću Pierce BCA Protein Assay kita. Apsorbance su očitane pomoću Tecan Spark čitača na mikropločicama. U mikropločice je pipetirano $23.5 \mu\text{L}$ fosfatnog pufera (0.1 M , $\text{pH } 7.2$), $1.5 \mu\text{L}$ uzorka i $200 \mu\text{L}$ radne otopine, pripremljene prema uputama iz kit-a. Mikropločice su zatim inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi (Slika 7). Apsorbanca je mjerena na 562 nm . Na isti način mjerila se i

apsorbanca proteina u standardu za koji su korištene različite koncentracije albumina iz goveđeg seruma (BSA), kako bi se dobila standardna krivulja. Ukupna koncentracija proteina u uzorku je na kraju određena uz pomoć jednadžbe pravca iz standardne krivulje te je izražena u mg/mL.



Slika 7. Mikropločice s puferom, uzorcima i radnom otopinom, nakon inkubacije od 2 h
(foto: Tea Tunuković)

2.4. Određivanje aktivnosti mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR)

Za procjenu aktivnosti MXR, odabrane su četiri koncentracije pesticida, jednake onima koje su korištene za mjerenje biomarkera, za aktivnu tvar petoksamid 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg i 10 mg/kg, odnosno 0.0833 mg/kg, 0.833 mg/kg, 4.165 mg/kg i 8.33 mg/kg za terbutilazin. Aktivnost MXR mjerena je pomoću zadržavanja rodamina B prema protokolu opisanom u Hackenberger i sur. (2012). U slučaju izlaganja herbicidu, osnovna otopina herbicida i osnovna otopina rodamina B kombinirane su kako bi se dobile odgovarajuće konačne koncentracije herbicida i konačna koncentracija rodamina B od 100 μ M. 20 mL konačne koncentracije rodamina B (100 μ M) i 20 mL određene koncentracije herbicida nanoseno je u 300 g tla, koje je promiješano kako bi se dobila homogena smjesa te je dodano deset gujavica u svaku posudu. Za kontrolu je 20 mL konačne koncentracije rodamina B od 100 μ M i 20 mL destilirane vode (dH₂O) podijeljeno po kontrolnoj posudi s

tlom. Gujavice su bile izložene 48 h u tami, na 20 °C. Na kraju izlaganja uzorci su pripremljeni isto kao i uzorci za mjerenje aktivnosti enzima (vidi postupak u 2.3.1.). Fluorescencija se mjerila pomoću Tecan Spark čitača na mikropločicama, pri ekscitaciji 553 nm i emisiji 578 nm dodavanjem 10 µL uzorka (S9) u 250 µL fosfatnog pufera. Kalibracijska krivulja se konstruirala pomoću rodamina B (RB), a količina RB u svakom uzorku izračunava se iz kalibracijske krivulje. Rezultati su izraženi u nmolima po mg proteina.

2.5. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u programu GraphPad Prism 5. Prvo je testirana normalnost distribucije (Shapiro–Wilk, D'agostino Pearson i Kolmogorov-Smirnov test) te zatim homogenost varijanci (Bartlett test). S obzirom na utvrđenu normalnu distribuciju, podaci su obrađeni parametarskom statistikom. Nakon primjene jednosmjerne (one-way) analize varijance (ANOVA), proveden je Dunnett post hoc test kako bi se utvrdile razlike među eksperimentalnim skupinama. Za analizu podataka dobivenih testom izbjegavanja, korišten je t-test. Testirana je značajnost na razini 5%.

3. REZULTATI

3.1. Test izbjegavanja

Rezultati testa izbjegavanja kod vrste *Eisenia andrei* izložene subletalnim koncentracijama dvije aktivne tvari, petoksamidu i terbutilazinu, mogu se vidjeti u Tablici 2. Najniža koncentracija nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolu, međutim, dvije najveće koncentracije (5 mg/kg i 10 mg/kg) značajno su se razlikovale u odnosu na kontrolu, te su gujavice izbjegavale tretirano tlo.

Tablica 2. Utjecaj pesticida na test izbjegavanja kod *Eisenia andrei* u tlu, * ($p < 0.05$).

| Koncentracija herbicida u tretiranom tlu [mg/kg] ^a | Distribucija gujavica [%] | | Odgovor izbjegavanja (A [%]) |
|---|---------------------------|---------------|------------------------------|
| | Kontrolno tlo | Tretirano tlo | |
| 0 | 49 | 51 | 2.22 |
| 1 | 57 | 43 | 13.33 |
| 5 * | 73 | 27 | 46.66 |
| 10 * | 81 | 19 | 62.22 |

^a Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

3.2. Aktivnost karboksilesteraze (CES) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu

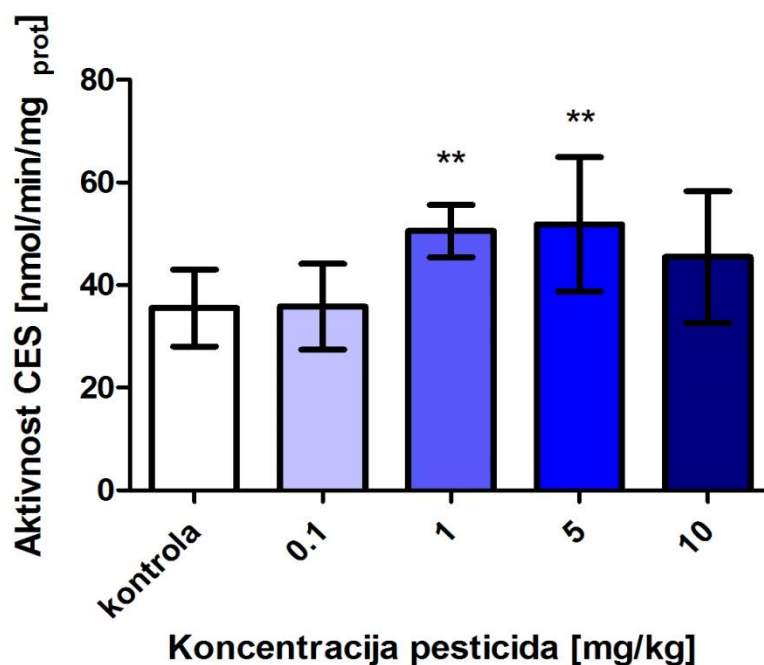
Rezultati specifične aktivnosti enzima CES izmjerene u gujavicama izloženim 48 h, 7 dana i 14 dana različitim koncentracijama pesticida prikazani su na slikama (8-10). 48 h nakon izlaganja pesticidu zabilježen je statistički značajan porast aktivnosti CES pri koncentracijama 1 i 5 mg/kg u odnosu na kontrolu. 7 i 14 dana nakon izlaganja pesticidu nisu utvrđene značajne razlike u aktivnosti CES u odnosu na kontrolu (Slika 9 i 10).

Srednje vrijednosti specifične enzimске aktivnosti pri svakoj koncentraciji nakon 48 h, 7 dana i 14 dana izlaganja prikazane su u Tablici 3.

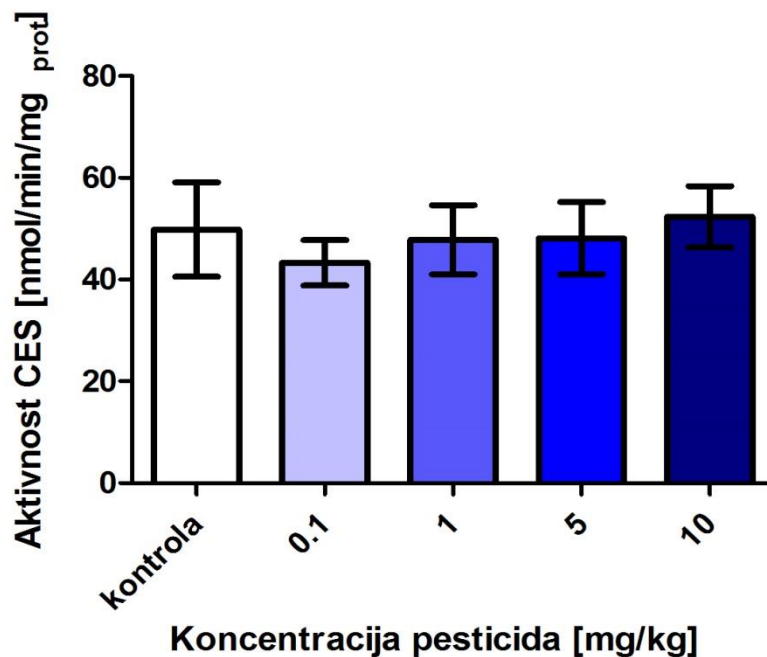
Tablica 3. Srednje vrijednosti specifične enzimске aktivnosti (CES) na svim koncentracijama pesticida 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu.

| Koncentracija herbicida u tretiranom tlu [mg/kg] ^a | Srednja vrijednost specifične enzimске aktivnosti [nmolmin ⁻¹ mgprot ⁻¹] | | |
|---|---|--------|---------|
| | 48 h | 7 dana | 14 dana |
| 0 | 35.56 | 49.84 | 58.28 |
| 0.1 | 35.83 | 43.28 | 53.06 |
| 1 | 50.55 | 47.83 | 58.77 |
| 5 | 51.85 | 48.13 | 54.54 |
| 10 | 45.47 | 52.34 | 52.19 |

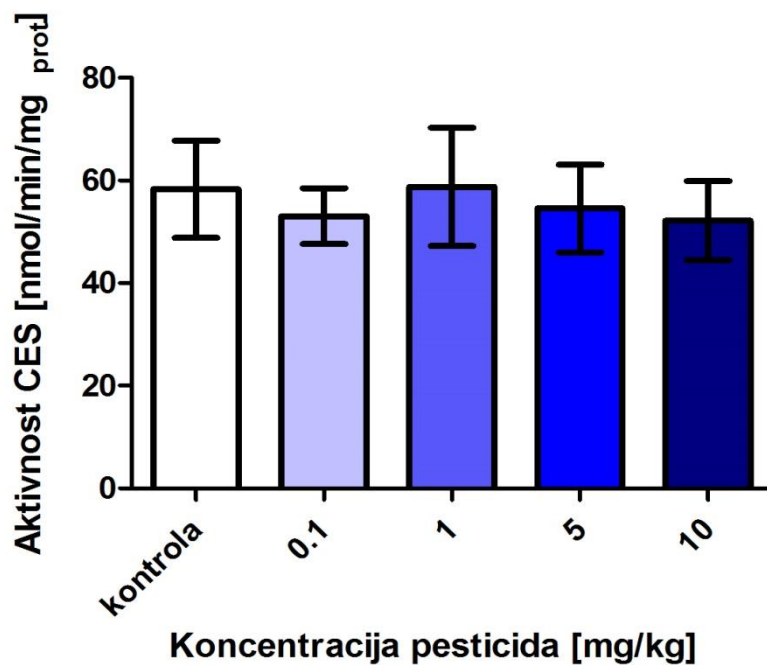
^a Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 8. Aktivnost karboksilesteraze (CES) 48 h nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: ** (p<0.01). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 9. Aktivnost karboksilesteraze (CES) 7 dana nakon izlaganja pesticidu. Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 10. Aktivnost karboksilesteraze (CES) 14 dana nakon izlaganja pesticidu. Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

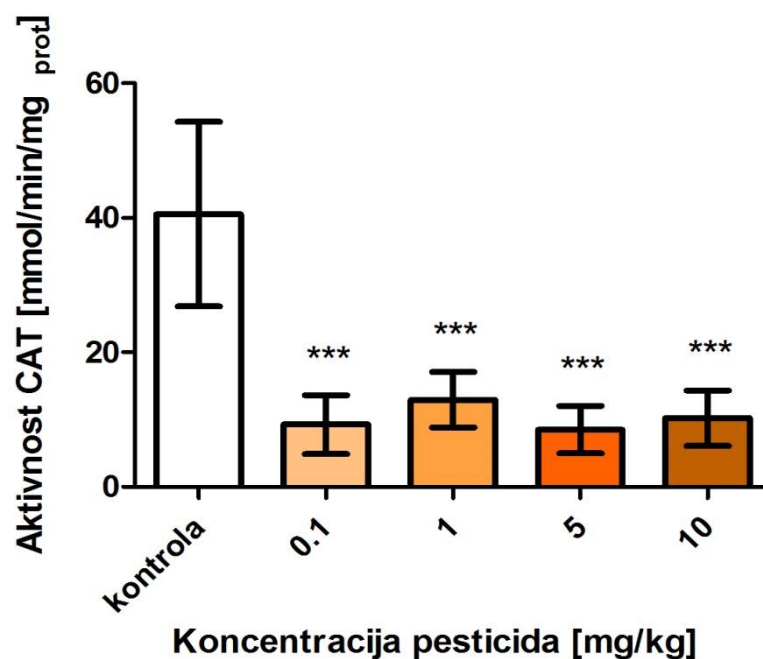
3.3. Aktivnost katalaze (CAT) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu

Rezultati specifične aktivnosti enzima CAT izmjerene u gujavicama izloženim 48 h, 7 dana i 14 dana različitim koncentracijama pesticida prikazani su na slikama (11-13). 48 h nakon izlaganja pesticidu vidljiva je inhibicija CAT na svim koncentracijama, sa statistički značajnom razlikom ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu (Slika 11). 7 dana nakon izlaganja, i dalje je vidljiv pad aktivnosti CAT, ali s blagim porastom u odnosu na izlaganje od 48 h. Utvrđena je statistički značajna inhibicija ($p < 0.001$) na svim koncentracijama u odnosu na kontrolu (Slika 12). 14 dana nakon izlaganja aktivnost CAT bila je na kontrolnoj razini bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Slika 13). Srednje vrijednosti specifične enzimске aktivnosti pri svakoj koncentraciji nakon 48 h, 7 dana i 14 dana izlaganja prikazane su u Tablici 4.

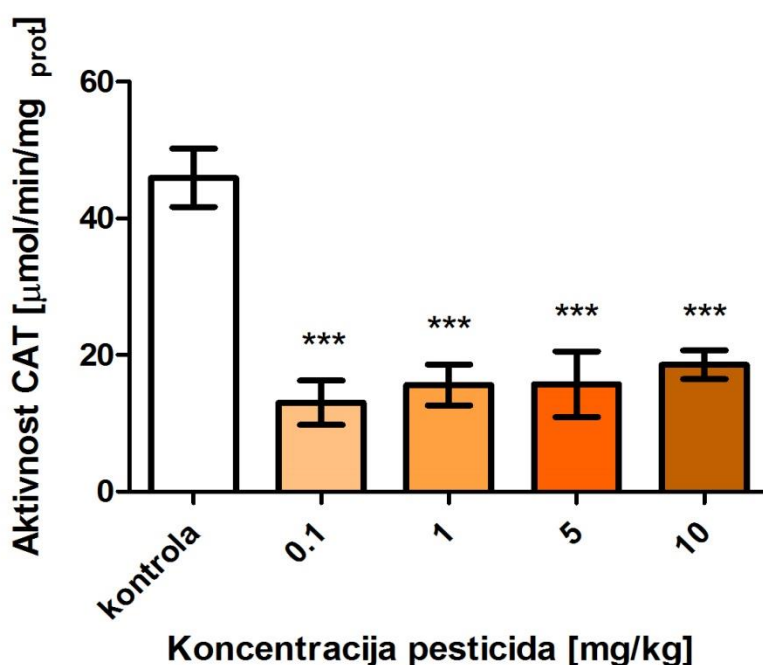
Tablica 4. Srednje vrijednosti specifične enzimске aktivnosti (CAT) na svim koncentracijama pesticida 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu.

| Koncentracija herbicida u tretiranom tlu [mg/kg] ^a | Srednja vrijednost specifične enzimске aktivnosti [nmolmin ⁻¹ mgprot ⁻¹] | | |
|---|---|--------|---------|
| | 48 h | 7 dana | 14 dana |
| 0 | 40.55 | 45.95 | 17.67 |
| 0.1 | 9.27 | 13.05 | 23.95 |
| 1 | 12.93 | 15.62 | 19.76 |
| 5 | 8.49 | 15.72 | 19.80 |
| 10 | 10.20 | 18.57 | 19.39 |

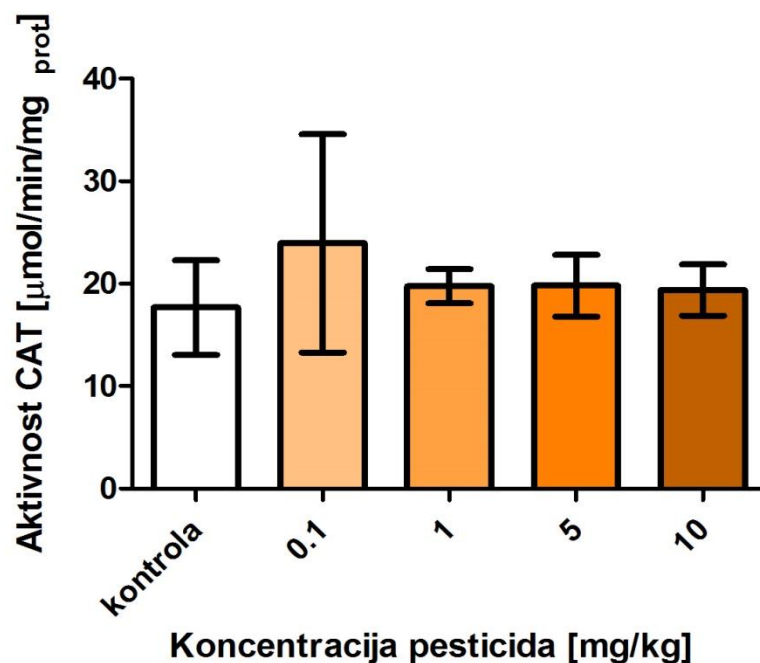
^aNavedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 11. Aktivnost katalaze (CAT) 48 h nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: *** ($p < 0.001$). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 12. Aktivnost katalaze (CAT) 7 dana nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: *** ($p < 0.001$). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 13. Aktivnost katalaze (CAT) 14 dana nakon izlaganja pesticidu. Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

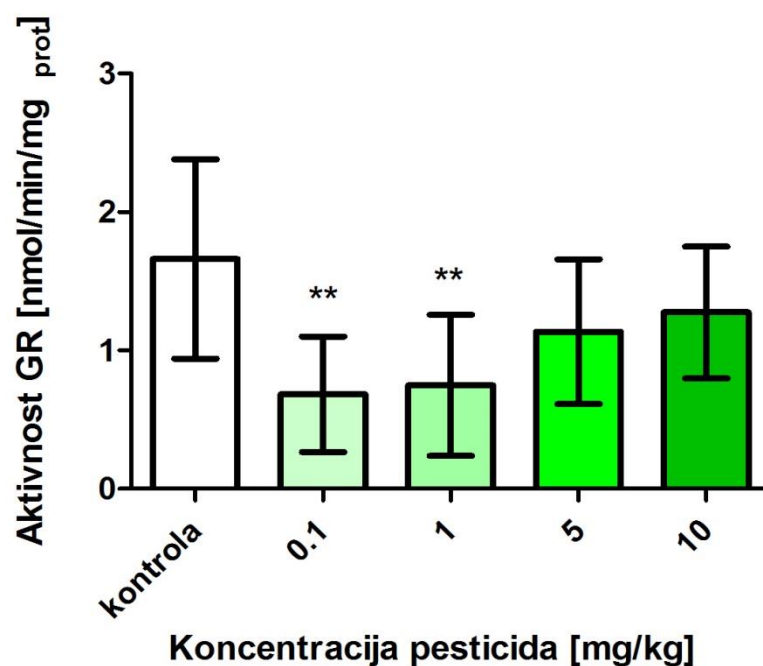
3.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu

Rezultati specifične aktivnosti enzima GR izmjerene u gujavicama izloženim 48 h, 7 dana i 14 dana različitim koncentracijama pesticida prikazani su na slikama (14-16). 48 h nakon izlaganja vidljiv je trend inhibicije GR na svim koncentracijama u odnosu na kontrolu. Statistički značajna razlika ($p < 0.01$) u odnosu na kontrolu zabilježena je na koncentracijama 0.1 i 1 mg/kg (Slika 14). 7 dana nakon izlaganja zabilježena je snažna inhibicija GR na svim koncentracijama (0.1, 1, 5, 10 mg/kg) sa statistički značajnom razlikom ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu (Slika 15). 14 dana nakon izlaganja aktivnost GR bila je na kontrolnoj razini, odnosno nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Slika 16). Srednje vrijednosti specifične enzimske aktivnosti pri svakoj koncentraciji nakon 48 h, 7 dana i 14 dana izlaganja prikazane su u Tablici 5.

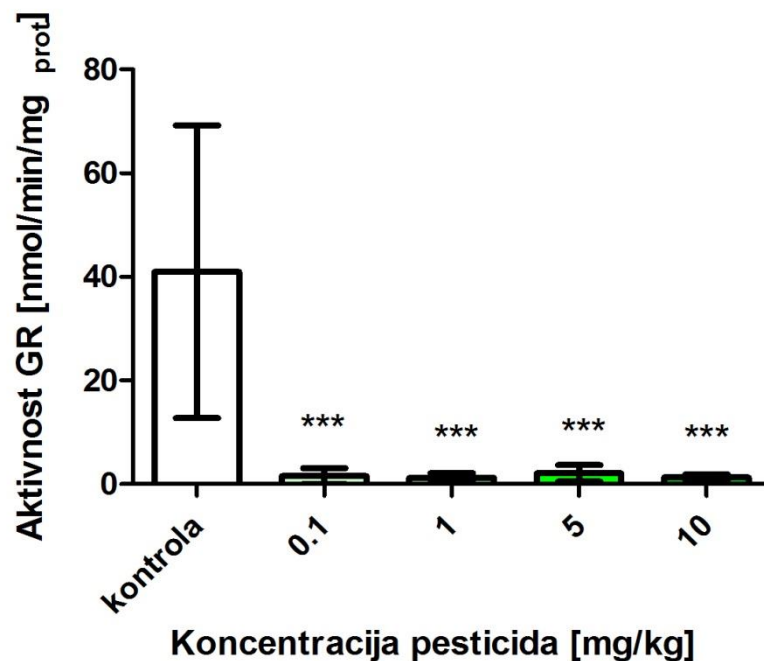
Tablica 5. Srednje vrijednosti specifične enzimске aktivnosti (GR) na svim koncentracijama pesticida 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu.

| Koncentracija herbicida u tretiranom tlu [mg/kg] ^a | Srednja vrijednost specifične enzimске aktivnosti [nmolmin ⁻¹ mgprot ⁻¹] | | |
|---|---|--------|---------|
| | 48 h | 7 dana | 14 dana |
| 0 | 1.66 | 40.97 | 0.99 |
| 0.1 | 0.68 | 1.59 | 1.53 |
| 1 | 0.75 | 1.23 | 1.28 |
| 5 | 1.14 | 2.12 | 1.15 |
| 10 | 1.28 | 1.32 | 0.95 |

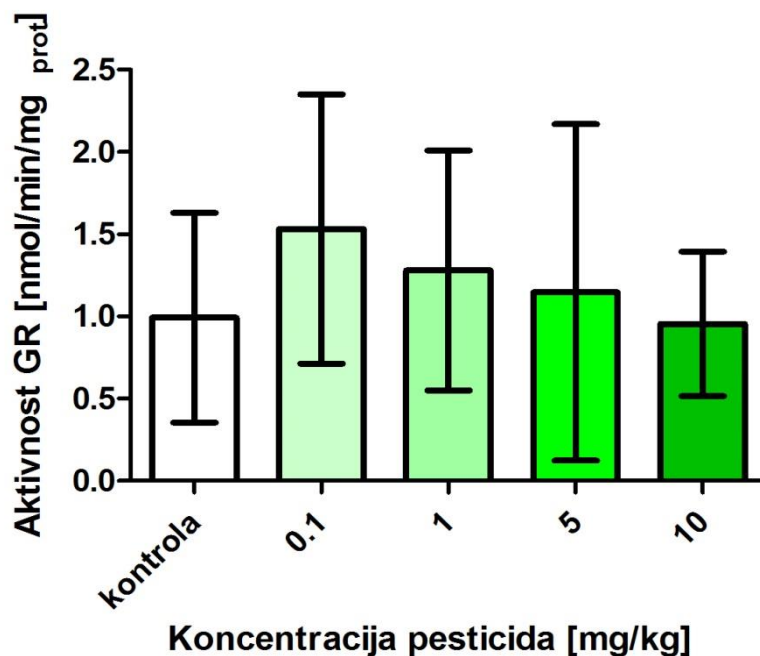
^aNavedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 14. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) 48 h nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: ** (p<0.01). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 15. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) 7 dana nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: *** ($p < 0.001$). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 16. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) 14 dana nakon izlaganja pesticidu. Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

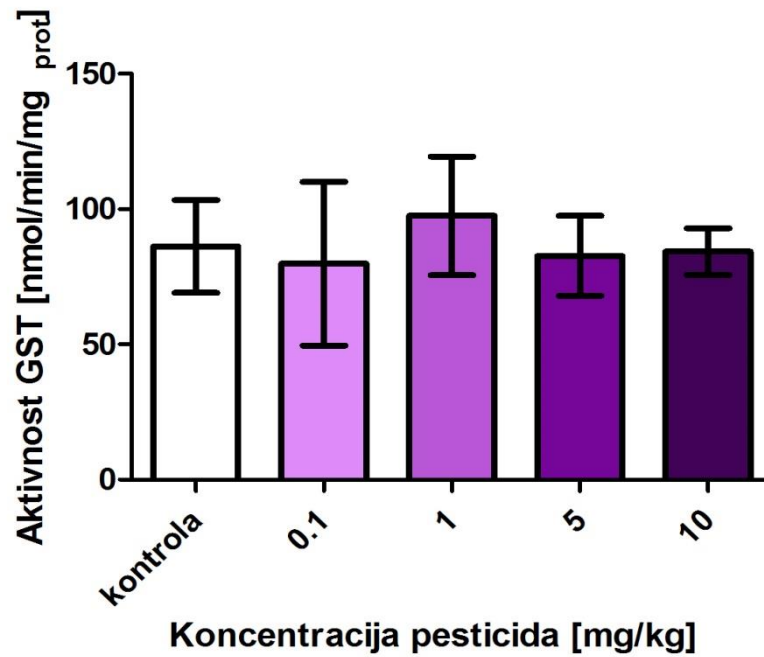
3.5. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu

Rezultati specifične aktivnosti enzima GST izmjerene u gujavicama izloženim 48 h, 7 dana i 14 dana različitim koncentracijama pesticida prikazani su na slikama (17-19). 48 sati nakon izlaganja nije bilo značajnih promjena u aktivnosti GST u odnosu na (Slika 17). 7 dana nakon izlaganja vidljiv je trend indukcije GST pri čemu je statistički značajna razlika ($p < 0.001$) utvrđena pri koncentraciji od 5 mg/kg (Slika 18). 14 dana nakon izlaganja također je vidljiv blagi porast aktivnosti sa statistički značajnom razlikom ($p < 0.01$) zabilježenom na koncentraciji od 1 mg/kg (Slika 19). Srednje vrijednosti specifične enzimske aktivnosti pri svakoj koncentraciji nakon 48 h, 7 dana i 14 dana izlaganja prikazane su u Tablici 6.

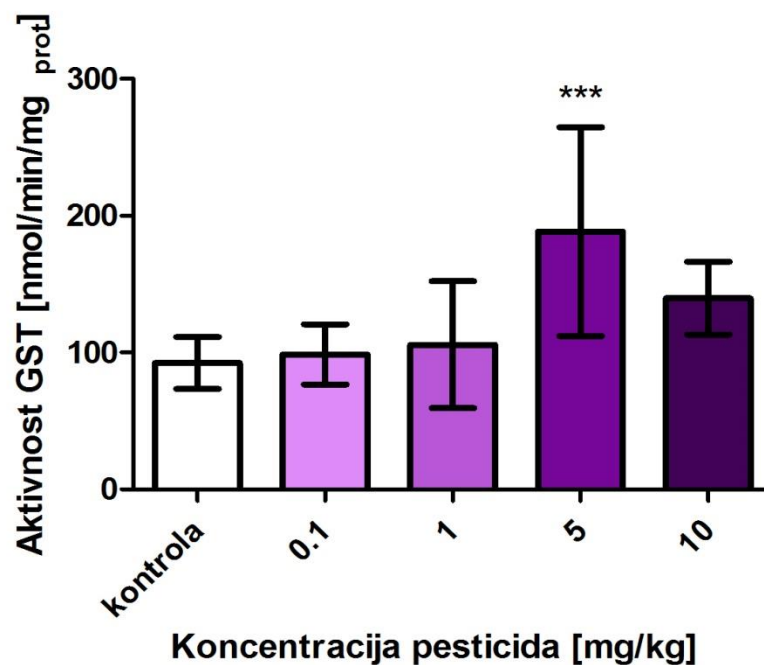
Tablica 6. Srednje vrijednosti specifične enzimske aktivnosti (GST) na svim koncentracijama pesticida 48 h, 7 dana i 14 dana nakon izlaganja pesticidu.

| Koncentracija herbicida u tretiranom tlu [mg/kg] ^a | Srednja vrijednost specifične enzimske aktivnosti [nmolmin ⁻¹ mgprot ⁻¹] | | |
|---|---|--------|---------|
| | 48 h | 7 dana | 14 dana |
| 0 | 86.16 | 92.31 | 91.52 |
| 0.1 | 79.78 | 98.59 | 115.56 |
| 1 | 97.52 | 105.67 | 131.27 |
| 5 | 82.71 | 188.38 | 107.42 |
| 10 | 84.33 | 139.74 | 104.05 |

^a Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

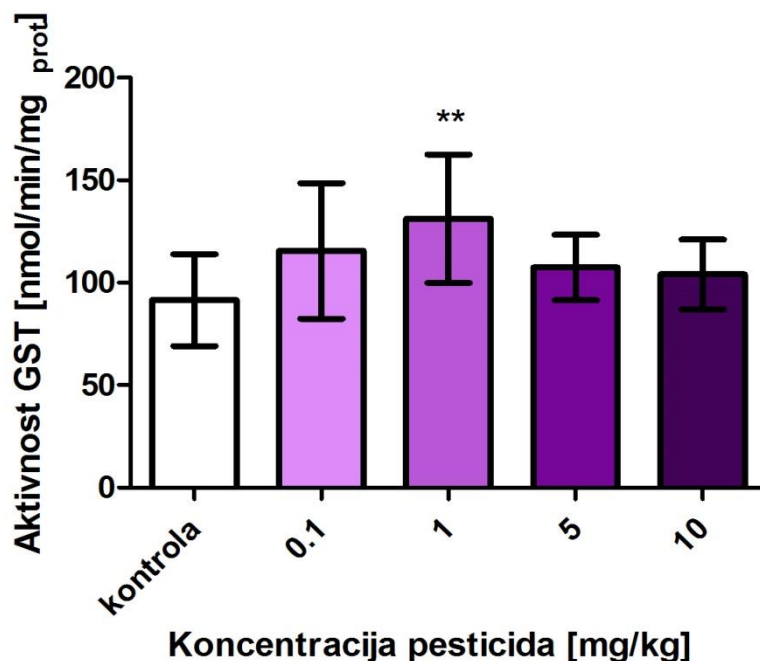


Slika 17. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) 48 h nakon izlaganja pesticidu. Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 18. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) 7 dana nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: *** ($p < 0.001$). Navedene koncentracije

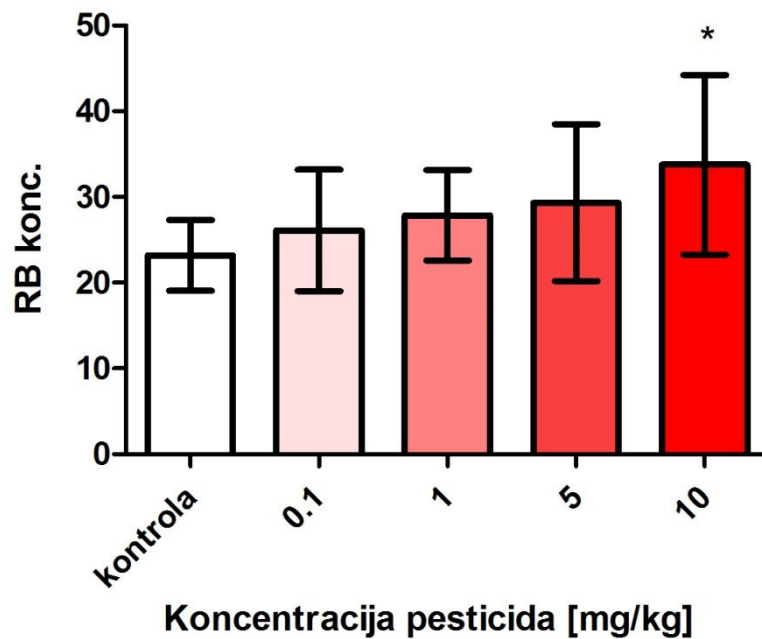
odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.



Slika 19. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) 14 dana nakon izlaganja pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: ** ($p < 0.01$). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

3.6. Aktivnost mehanizma multiksenobiotičke otpornosti (MXR) 48 h nakon izlaganja pesticidu

Rezultati koncentracija rodamina B izmjerenih u gujavicama izloženim različitim koncentracijama pesticida, prikazani su na Slici 20. Izlaganje svim koncentracijama pesticida uzrokovalo je povećanje koncentracije akumuliranog rodamina B, što ukazuje na inhibiciju aktivnosti MXR. Statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu zabilježena je na najvećoj koncentraciji pesticida od 10 mg/kg (Slika 20).



Slika 20. Koncentracija rodamina B (RB) izmjerena u gujavicama 48 h izloženim pesticidu. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0.05$). Navedene koncentracije odnose se na aktivnu tvar petoksamid. Aktivna tvar terbutilazin je prisutna u 17% manjoj koncentraciji.

4. RASPRAVA

S obzirom da intenzivna upotreba pesticida u poljoprivredi može imati štetan učinak za ekosustav tla i organizme u tlu, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak herbicida Koban T, kombiniranog pripravka koji sadrži aktivne tvari petoksamid i terbutilazin, na gujavice vrste *Eisenia andrei*. Učinak ovog herbicida na ekosustav tla dosada je slabo istražen. Nedavno su Velki i sur. (2019) prvi proučavali učinke ovog herbicida na gujavice primjenom kontaktnog filter papir testa. Na temelju dobivenih rezultata i izračunatih letalnih koncentracija klasificirali su Koban T kao izrazito toksičan herbicid za vrstu *E. andrei* (Velki i sur., 2019). Učinak mješavine petoksamida i terbutilazina, aktivnih tvari sadržanih u herbicidu Koban T, na odgovor mikroorganizama i enzima tla istražili su Wyszowska i sur. (2016), te utvrdili da onečišćenje tla testiranim herbicidom ima značajan utjecaj na broj mikroorganizama u tlu, odnosno da dolazi do smanjenja broja oligotrofnih sporulacijskih bakterija, *Azotobacteria*, aktinomiceta i gljiva, te se povećava ukupan broj oligotrofnih bakterija. Također su utvrdili da petoksamid i terbutilazin zajedno snažno inhibiraju aktivnost svih ispitivanih enzima (dehidrogenaze, fosfataze, ureaze, β -glukozidaze, arilsulfataze i katalaze). S obzirom na mali broj istraživanja, i općenito nedostatak informacija o djelovanju ovog herbicida na gujavice, u ovom radu istražen je utjecaj kombiniranog herbicida Koban T na ponašanje gujavica, aktivnost enzima CES, CAT, GR, GST te na aktivnost MXR.

Prvi dio istraživanja uključivao je test izbjegavanja gujavica u tlu tretiranom istraživanim herbicidom. Promjene u ponašanju organizama prvi su odgovor na izmijenjene uvjete, a mogu imati presudne učinke na cijeli ekosustav, stoga se test izbjegavanja smatra ekološki relevantnim u odnosu na druge krajnje učinke (Wong i Candolin, 2015). Rezultati su pokazali da istraživani herbicid uzrokuje značajno izbjegavanje gujavica pri najvećim testiranim koncentracijama herbicida. Pri najvećoj koncentraciji zabilježeno je svega 19 % gujavica u tretiranom tlu, a 81 % u netretiranom tlu. Nisu pronađena druga istraživanja utjecaja petoksamida i terbutilazina na ponašanje gujavica, ali su provedena brojna istraživanja u kojima je dokazan utjecaj drugih pesticida na ponašanje gujavica (Lackmann i sur., 2018; Sousa i Andréa, 2011; Perreira i sur., 2010; Garcia i sur., 2008; Casabé i sur., 2007; Loureiro i sur., 2005). De Silva i Amarasinghe (2008) utvrdili su da je gujavica *E. andrei* značajno izbjegavala tlo tretirano insekticidom dimetoatom. Garcia i sur. (2008) proučavali su ponašanje gujavica *E. fetida* izloženih

fungicidima u tropskim uvjetima (veće temperature). Sousa i Andréa (2011) zabilježili su učinke piretroidnog insekticida, cipermetrina na ponašanje *E. andrei*. Lackmann i sur. (2018) utvrdili su učinke dvaju herbicida, diurona i fluazifop-p-butila, na ponašanje vrste *E. andrei*, gdje su oba herbicida izazvala značajan odgovor izbjegavanja. Malo je istraživanja ovakvog oblika provedeno na herbicidima jer se zbog njihovog načina djelovanja smatraju manje toksičnima za neciljne organizme, za razliku od insekticida i fungicida (Lackmann i sur., 2018).

Toksičnost pesticida može biti povezana s povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) što rezultira oksidativnim oštećenjem (Oruc, 2010). Kao biomarkeri oksidativnog stresa u ovom istraživanju mjerile su se aktivnosti enzima CAT i GR. Rezultati su pokazali su značajnu supresiju aktivnosti CAT kod gujavica 48 h nakon izlaganja svim testiranim koncentracijama herbicida. 7 dana nakon izlaganja herbicidu zabilježeno je značajno smanjenje aktivnosti CAT na svim koncentracijama herbicida, ali je također vidljiv blagi trend porasta u odnosu na rezultate nakon 48 h izlaganja. Nekoliko istraživanja je pokazalo da se u slučaju prekomjerne proizvodnje superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$) inhibira aktivnost CAT (Bagnyukova i sur., 2005; Geret i sur., 2002; Kono i Fridovich, 1982), stoga se ovakvi rezultati smanjene aktivnosti CAT potencijalno mogu objasniti velikom proizvodnjom superoksidnog radikala. Međutim, 14 dana nakon izlaganja herbicidu dolazi do povećanja aktivnosti CAT na svim koncentracijama u odnosu na kraća izlaganja, odnosno aktivnost se vraća na kontrolnu razinu. Postoji više mogućih objašnjenja porasta aktivnosti katalaze 14 dana nakon izlaganja herbicidu, poput oporavka enzima, metaboličke prilagodbe prilikom stalne izloženosti pesticidu te odgovora na obranu od oksidativnog stresa. Ovakvom odgovoru vjerojatno doprinosi i smanjenje koncentracije herbicida u tlu s vremenom jer tlo tijekom eksperimenta nije mijenjano. Ne postoje istraživanja koja su mjerila aktivnost CAT nakon izlaganja petoksamidu i terbutilazinu, ali je inhibicija aktivnosti CAT u gujavicama zabilježena nakon izlaganja različitim pesticidima (Ferrari i sur., 2011; Song i sur., 2009; Schreck i sur., 2008; Altuntas i sur., 2003). Velki i Hackenberger (2012) pokazali su da dimetoat uzrokuje inhibiciju aktivnosti CAT 48 h nakon izlaganja u vrstama gujavica *Eisenia andrei* i *Octolasion lacteum*. Li i sur. (2018) su pokazali da herbicid mezotrion uzrokuje povećanje aktivnosti katalaze 7, 14, 21 i 28 dana nakon izlaganja kod vrste *E. fetida*. U istraživanju Velki i Hackenberger (2013a) zabilježena je inhibicija aktivnosti CAT u gujavicama (*E. andrei* i *L. rubellus*) 1 dan i 15 dana nakon izlaganja dimetoatu. Nakon 15 dana izlaganja

pirimifos-metilu, zabilježeno je povećanje aktivnosti CAT u obje vrste gujavica. Dan nakon izlaganja deltametrinu došlo je do porasta aktivnosti CAT kod vrste *E. andrei* i smanjenja aktivnosti CAT kod vrste *L. rubellus* (Velki i Hackenberger, 2013a). Uz rezultate aktivnosti CAT, važno je uzeti u obzir i rezultate mjerenja GR. GR sudjeluje u održavanju visokog odnosa GSH/GSSG i redoks ravnoteže u stanici, zbog čega je značajan enzim u antioksidacijskom sustavu stanice (Mullineaux i Creissen, 1997). U ovom istraživanju, slično rezultatima mjerenja CAT, zabilježena je značajna inhibicija aktivnosti GR 48 h nakon izlaganja. Također, i 7 dana nakon izlaganja dolazi do još snažnije inhibicije aktivnosti GR. Budući da se GSSG u stanici smanjuje putem GR uz prisutnost NADPH te se na taj način u stanici povećava nivo GSH (Halliwell i Gutteridge, 2015; Flohe, 1982), pretpostavlja se da je došlo do promjene raspoloživosti NADPH, što utječe na aktivnost GR i regeneraciju GSH, te se pospješuje akumulacija GSSG u stanici. 14 dana nakon izlaganja herbicidu, aktivnost GR se vratila na kontrolne razine, odnosno došlo je do oporavka. Moguće je da je, kao i u slučaju CAT, došlo do smanjenja koncentracije herbicida u tlu tokom duljeg izlaganja. U slučaju oksidativnog stresa dolazi do promjene odnosa GSH/GSSG (Griffith, 1980), pa je moguće da je došlo do uspostavljanja redoks ravnoteže GSH/GSSG što je zatim dovelo i do oporavka GR. Maity i sur. (2008) dobili su slične rezultate aktivnosti GR u gujavicama *Lampito mauritii* prilikom izlaganja olovu (Pb). U istraživanju je opažen značajan pad aktivnosti GR u *L. mauritii* nakon 7 dana izlaganja te porast aktivnosti GR 14 dana nakon izlaganja. Plhalova i sur. (2012) proveli su 28-dnevno ispitivanje u kojemu su zebrice *Danio rerio* bile izložene terbutilazinu, te su više koncentracije (>400 µg/L) uzrokovale značajno smanjenje aktivnosti GR. S obzirom na uočene promjene u aktivnosti CAT i GR u ovom istraživanju, može se zaključiti da je toksičnost testiranog herbicida povezana s indukcijom oksidativnog stresa.

Enzimi CES (enzim faze I metabolizma) i GST (enzim faze II metabolizma) odabrani su kao važni enzimi u postupku detoksifikacije pesticida. Rezultati su pokazali indukciju aktivnosti CES u gujavicama 48 h nakon izlaganja herbicidu, dok je 7 i 14 dana nakon izlaganja aktivnost CES bila na kontrolnoj razini. Povećanje aktivnosti CES ukazuje na povećano metaboliziranje pesticida. Iako nema drugih istraživanja utjecaja petoksamida i terbutilazina na aktivnost CES u gujavicama ili drugim organizmima, postoje istraživanja utjecaja drugih pesticida na CES. Primjerice, Wang i sur. (2019) su zabilježili trend povećanja aktivnosti CES u *E. fetida* 14 dana nakon izlaganja imidaklopridu. Suprotno tome, Velki i Hackenberger (2013a) su zabilježili da organofosforni insekticid dimetoat

uzrokuje značajnu inhibiciju aktivnosti CES u gujavicama. Mjerenjem aktivnosti GST nisu utvrđene značajne promjene 48 h nakon izlaganja istraživanom herbicidu, dok je nakon 7 i 14 dana izlaganja, na određenim koncentracijama, došlo do značajne indukcije aktivnosti GST. Ovi rezultati mogu se objasniti različitim vremenom izlaganja. Naime, GST je enzim koji pripada II fazi biotransformacije, te se pretpostavlja da je potreban duži vremenski period izlaganja herbicidu kako bi se inducirao. Slične rezultate dobili su i Velki i Hackenberger (2013c) koji su utvrdili da insekticid dimetoat ne uzrokuje promjene u aktivnosti GST 1, 3 i 6 dana nakon izlaganja, dok nakon 10 i 15 dana dolazi do značajnog povećanja aktivnosti GST. Uočene promjene u aktivnosti CES i GST ukazuju na uključenost enzima faze I i II biotransformacije u metaboliziranje testiranog herbicida.

Mnogi organizmi u okolišu mogu preživjeti, čak i u visoko zagađenim područjima, zbog izbacivanja toksičnih tvari iz stanice putem transportnih proteina i detoksifikacijskih enzima (Epel i sur., 2008). Hackenberger i sur. (2012) prvi su dokazali prisutnost crpki za izbacivanje ksenobiotika u vrsti *E. andrei*. U ovom radu izloženost gujavica *E. andrei* herbicidu pokazala je trend povećanja koncentracije RB, sa značajnim povećanjem pri najvišoj testiranoj koncentraciji, što ukazuje na inhibiciju aktivnosti MXR. Inhibicijom aktivnosti MXR dolazi do smanjenog izbacivanja RB i posljedično dužeg zadržavanja u organizmu. Utjecaj herbicida Koban T na aktivnost MXR mjeren je i u istraživanju Velki i sur. (2019), gdje je primjenom filter papir testa također zabilježena inhibicija aktivnosti MXR 48 h nakon izlaganja. Slični rezultati dobiveni su i nakon izlaganja gujavica drugim pesticidima. Primjerice, inhibicija aktivnosti efluks crpke u gujavica zabilježena je nakon izlaganja insekticidu dimetoatu (Velki i Hackenberger, 2012), insekticidima pirimifosmetilu i deltametrinu (Velki i Hackenberger, 2013b), te herbicidima diuronu i fluazifop-*p*-butilu (Lackmann i sur., 2018). Inhibicija aktivnosti efluks crpke može dovesti do veće toksičnosti pesticida zbog njihovog dužeg zadržavanja u stanicama (Hackenberger i sur., 2012).

5. ZAKLJUČAK

Kako bi se utvrdilo djelovanje herbicida Koban T na gujavice vrste *E. andrei*, mjerile su se promjene u ponašanju gujavica, aktivnosti enzima CES, CAT, GR, GST i aktivnost MXR. U istraživanju je vrsta *Eisenia andrei* bila izložena različitim koncentracijama herbicida. Na temelju dobivenih rezultata mogu se donijeti slijedeći zaključci:

- Herbicid Koban T (petoksamid 300 g/L + terbutilazin 250 g/L) značajno utječe na ponašanje gujavica i dovodi do snažnog odgovora izbjegavanja tretiranog tla.
- Izlaganje herbicidu Koban T (petoksamid 300 g/L + terbutilazin 250 g/L) uzrokovalo je značajne promjene u aktivnosti enzima CES, CAT, GR i GST u gujavicama.
- Promjena u aktivnosti enzima ovisila je o vremenu izlaganja (48 h, 7 dana, 14 dana) i o koncentracijama herbicida.
- Izlaganje herbicidu Koban T (petoksamid 300 g/L + terbutilazin 250 g/L) uzrokovalo je inhibiciju aktivnosti MXR.

6. LITERATURA

Allaire-Leung, S. E., Gupta, S. C., & Moncrief, J. F. (2000). Water and solute movement in soil as influenced by macropore characteristics: 1. Macropore continuity. *Journal of Contaminant Hydrology*, 41: 283-301.

Altuntas, I., Delibas, N., Doguc, D. K., Ozmen, S., & Gultekin, F. (2003). Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, 17: 153-157.

Amorim, M. J., Römbke, J., & Soares, A. M. (2005). Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere*, 59: 501-510.

Bagnyukova, T. V., Vasykiv, O. Y., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2005). Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain research*, 1052: 180-186.

Bernier, N. (1998). Earthworm feeding activity and development of the humus profile. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 215-223.

Blackmore, C. G., McNaughton, P. A., & Veen, H. W. V. (2001). Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Molecular membrane biology*, 18: 97-103.

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(2), 161-182.

Bokulić, A., Budinščak, Ž., Čelig, D., Deždek, B., Hamel, D., Ivić, D., ... & Novaković, V. (2015). Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja. Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo–Zavod za zaštitu bilja. Dostupno na: <https://www.savjetodavna.hr/product-category/zastita-bilja/>

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

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

- Brami, C., Glover, A. R., Butt, K. R., & Lowe, C. N. (2017). Effects of silver nanoparticles on survival, biomass change and avoidance behaviour of the endogeic earthworm *Allolobophora chlorotica*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 141: 64-69.
- Brown, P. J., Long, S. M., Spurgeon, D. J., Svendsen, C., & Hankard, P. K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57: 1675-1681.
- Brulle, F., Morgan, A. J., Cocquerelle, C., & Vandebulcke, F. (2010). Transcriptomic underpinning of toxicant-mediated physiological function alterations in three terrestrial invertebrate taxa: a review. *Environmental Pollution*, 158: 2793-2808.
- Brunner, B., Viswanathan, R., & Beese, F. (1994). Terbutylazine and carbofuran effects on growth and reproduction within three generations of *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Biology and fertility of soils*, 18: 83-88.
- Buss, D. S., & Callaghan, A. (2008). Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pesticide biochemistry and physiology*, 90: 141-153.
- Bustos-Obregón, E., & Goicochea, R. I. (2002). Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian journal of andrology*, 4: 195-200.
- Bünemann, E. K., Schwenke, G. D., & Van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Soil Research*, 44: 379-406.
- Callahan, C. A. (1984). Earthworms as ecotoxicological assessment tools. United States Environmental Protection Agency. EPA-600/D-48-272.
- Caracciolo, A. B., Giuliano, G., Grenni, P., Cremisini, C., Ciccoli, R., & Ubaldi, C. (2005). Effect of urea on degradation of terbutylazine in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24: 1035-1040.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. In *Methods in enzymology* (Vol. 113, pp. 484-490). Academic press.
- Casabé, N., Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M. L., Pamparato, L., Basack, S., ... & Kesten, E. (2007). Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7: 232-239.

- Chen, C. H. (2011). Activation and detoxification enzymes: functions and implications. Springer Science & Business Media.
- Claiborne, A. (1985). Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton.
- Clark, A. G., & Smith, J. N. (1975). Glutathione S-aryltransferase as a model for the glutathione S-transferases. Environmental quality and safety. Supplement, 3: 346.
- Cook, A. G., Critchley, B. R., Critchley, U., Perfect, T. J., & Yeadon, R. (1980). Effects of cultivation and DDT on earthworm activity in a forest soil in the sub-humid tropics. Journal of applied ecology, 21-29.
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. European Journal of Soil Biology, 35: 115-134.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. International journal of environmental research and public health, 8: 1402-1419.
- Darwin, C. (1892). The formation of vegetable mould through the action of worms: with observations on their habits (Vol. 37). Appleton.
- De Silva, P. M. C. S., & Amarasinghe, N. D. S. (2008). Assessment of dimethoate toxicity on compost worm (*Eisenia andrei*) using earthworm avoidance test.
- De Silva, P. M. C., & van Gestel, C. A. (2009). Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. Chemosphere, 77: 1609-1613.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., & Jewell, C. S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 8: 1103-1123.
- Dokić, M., Bilandžić, N., & Briški, F. (2012). Postupci uklanjanja pesticida iz okoliša. Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske, 61: 341-348.

- Dominguez, J. (2004). State-of-the-Art and New Perspectives on Vermicomposting Research. In *Earthworm ecology* (pp. 401-424). CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Ečimović, S., Velki, M., Vuković, R., Čamagajevac, I. Š., Petek, A., Bošnjaković, R., ... & Ivanković, D. (2018). Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere*, 212: 307-318.
- Edwards, C. A., & Pimentel, D. (1989). Impact of herbicides on soil ecosystems. *Critical reviews in plant sciences*, 8: 221-257.
- Edwards, C. A., & Bohlen, P. J. (1996). *Biology and ecology of earthworms* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Edwards, C. A., Subler, S., Chen, S. K., Bogomolov, D. M., Straalen, N. M., & Krivolutsky, D. A. (1995). Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. *Bioindicator systems for soil pollution*, 67-84.
- 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.
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C. N., MacManus-Spencer, L. A., Hamdoun, A., & Smital, A. T. (2008). Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants.
- Eytan, G. D., Regev, R., Oren, G., Hurwitz, C. D., & Assaraf, Y. G. (1997). Efficiency of P-glycoprotein-Mediated Exclusion of Rhodamine Dyes from Multidrug-Resistant Cells is Determined by their Passive Transmembrane Movement Rate. *European journal of biochemistry*, 248: 104-112.
- Ferrari, A., Lascano, C., de D'Angelo, A. M. P., & Venturino, A. (2011). Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153: 34-39.

- Fidaleo, M. (2010). Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Experimental and toxicologic pathology*, 62: 615-625.
- Fingler, S., Mendaš, G., Dvorščak, M., Stipičević, S., Vasilić, Ž., & Drevenkar, V. (2017). Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 11017-11030.
- Fischer, E. (1989). Effects of atrazine and paraquat-containing herbicides on *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta). *Zoologischer Anzeiger*, 223: 291-300.
- Flohé, L. (1982). Glutathione peroxidase brought into focus. *Free radicals in biology*, 5: 223-253.
- Forson, D. D., & Storfer, A. (2006). Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecological Applications*, 16: 2325-2332.
- Fragoso, C., Brown, G. G., Patron, J. C., Blanchart, E., Lavelle, P., Pashanasi, B., ... & Kumar, T. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of earthworms. *Applied soil ecology*, 6: 17-35.
- Fründ, H. C., Butt, K., Capowiez, Y., Eisenhauer, N., Emmerling, C., Ernst, G., ... & Schrader, S. (2010). Using earthworms as model organisms in the laboratory: recommendations for experimental implementations. *Pedobiologia*, 53: 119-125.
- Gao, Y., Sun, X., Sun, Z., Zhao, N., & Li, Y. (2008). Toxic effects of enrofloxacin on growth rate and catalase activity in *Eisenia fetida*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 26: 177-180.
- Garcia, M., Römbke, J., de Brito, M. T., & Scheffczyk, A. (2008). Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution*, 153: 450-456.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., & Bebianno, M. J. (2002). Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*, 7: 242-256.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50: 977-987.

- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*, 106: 207-212.
- Habdija, I., Habdija, B. P., Radanović, I., Špoljar, M., Kepčija, R. M., Karlo, S. V., ... & Perić, M. S. (2011). *Protista-Protozoa and Metazoa-Invertebrates: structure and function*.
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In *Methods in enzymology* (Vol. 77, pp. 398-405). Academic press.
- 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. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. 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.
- Heimbach, F. (1984). Correlations between three methods for determining the toxicity of chemicals to earthworms. *Pesticide science*, 15: 605-611.
- Hole, D. G., Perkins, A. J., Wilson, J. D., Alexander, I. H., Grice, P. V., & Evans, A. D. (2005). Does organic farming benefit biodiversity?. *Biological conservation*, 122: 113-130.
- Hosokawa, M., & Satoh, T. (2001). Measurement of carboxylesterase (CES) activities. *Current protocols in Toxicology*, 10: 4-7.
- 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.
- ISO (1993) Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate ISO 11268-1. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (1998) Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. International Standardization Organization, Geneva.

ISO (2008) Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO 17512-1. International Standardization Organization, Geneva.

Jager, T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17: 2080-2090.

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

Jursík, M., Kočárek, M., Hamouzová, K., Soukup, J., & Venclová, V. (2013). Effect of precipitation on the dissipation, efficacy and selectivity of three chloroacetamide herbicides in sunflower. *Plant, Soil and Environment*, 59: 175-182.

Klapec, T., Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić-Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., & Katalenić, M. D. N. (2010). Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu (HAH). Zagreb.

Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M., & Zak, A. (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia biologica*, 60: 153.

Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 5751-5754.

Labrot, F., Ribera, D., Denis, M. S., & Narbonne, J. F. (1996). In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1: 21-28.

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.

Łaszczyca, P., Augustyniak, M., Babczyńska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., ... & Witas, I. (2004). Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environment International*, 30: 901-910.

- 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: S3-S15.
- Lee, K. E. (1985). *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press Inc..
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*, 167: 3-23.
- Li, X. Y., Luo, Y. R., Yun, M. X., Wang, J., & Wang, J. J. (2010). Effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the anti-oxidant system of earthworm. *Chemosphere*, 78: 853-858.
- Li, X., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J., & Zhu, Y. (2018). Mesotrione-induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecological indicators*, 95: 436-443.
- Liroff, R. A. (2000). Balancing risks of DDT and malaria in the global POPs treaty. *Pestic Safety News*, 4(3).
- 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.
- Lorenz, R., Brüggemann, R., Steinberg, C. E. W., & Spieser, O. H. (1996). Humic material changes effects of terbutylazine on behavior of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere*, 33: 2145-2158.
- Loureiro, S., Soares, A. M., & Nogueira, A. J. (2005). Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental pollution*, 138: 121-131.
- Lovaković, B. T., Pizent, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Micek, V., Mendaš, G., ... & Vrdoljak, A. L. (2017). Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. *Food and chemical toxicology*, 108: 93-103.

- 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.
- Lydy, M. J., & Linck, S. L. (2003). Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 343-349.
- Ma, W. C., & Bodt, J. (1993). Differences in toxicity of the insecticide chlorpyrifos to six species of earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) in standardized soil tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 864-870.
- Maceljiski, M., Cvjetković, B., Igrc Barčić, J., & Ostojić, Z. (1997). Zaštita bilja–općid. U: Priručnik iz zaštite bilja: za zaposlenike u poljoprivrednim ljekarnama. Zagreb, Tiskara MD, 27-34.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. In *Plant, soil and microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham.
- Maity, S., Roy, S., Chaudhury, S., & Bhattacharya, S. (2008). Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental pollution*, 151: 1-7.
- Majewski, M. S., & Capel, P. D. (1996). *Pesticides in the atmosphere: distribution, trends, and governing factors*. CRC Press.
- Man, L. A. N. G., & Zucong, C. A. I. (2009). Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 458-467.
- Milanović J., Milutinović T., Stojanović M. (2014). Effects of three pesticides on the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny 1826) under laboratory conditions: assessment of mortality, biomass and growth inhibition. *European journal of soil biology*, 62: 127–131.
- Morgan, A. J., Kille, P., & Stürzenbaum, S. R. (2007). Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental science & technology*, 41: 1085-1096.
- Mullineaux, P. M., & Creissen, G. P. (1997). Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34: 667-713

- Muthukaruppan, G., Janardhanan, S., & Vijayalakshmi, G. (2005). Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes (5 pp). *Journal of Soils and Sediments*, 5: 82-86.
- Naito, Y., Masaichi, C. I. L., Kato, Y., Nagai, R., & Yonei, Y. (2010). Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine*, 7: 36-44.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- Nielsen, D., & Skovsgaard, T. (1992). P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1139: 169-183.
- OECD (1984). Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test). Vol. 207. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2004). Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*), vol. 222. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- 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*.
- Paoletti, M. G. (1999). The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74: 137-155.
- 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.

Pilling, E. D., & Jepson, P. C. (1993). Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pesticide Science*, 39: 293-297.

Pleasant, J. M., McCollum, R. E., & Coble, H. D. (1990) Weed population dynamics and weed control in the peruvian amazon.--p. 102-112.

Plhalova, L., Stepanova, S., Blahova, J., Praskova, E., Hostovsky, M., Skoric, M., ... & Bedanova, I. (2012). The effects of subchronic exposure to terbuthylazine on zebrafish. *Neuro endocrinology letters*, 33: 113-119.

PPDB, 2018. Pesticide Properties Database, University of Hertfordshire. Dostupno na: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>

Prentø, P. (1987). Distribution of 20 enzymes in the midgut region of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L., with particular emphasis on the physiological role of the chloragog tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 87: 135-142.

Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., & Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55: 803-813.

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.

Relyea, R. A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological applications*, 15: 1118-1124.

Robidoux, P. Y., Svendsen, C., Sarrazin, M., Thiboutot, S., Ampleman, G., Hawari, J., ... & Sunahara, G. I. (2004). Assessment of a 2, 4, 6-trinitrotoluene-contaminated site using *Aporrectodea rosea* and *Eisenia andrei* in mesocosms. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 48: 56-67.

Rodríguez-Castellanos, L., & Sanchez-Hernandez, J. C. (2007). Earthworm biomarkers of pesticide contamination: current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science*, 0710050002-0710050002.

- Rodríguez-Cruz, M. S., Pose-Juan, E., Marín-Benito, J. M., Igual, J. M., & Sánchez-Martín, M. J. (2019). Pethoxamid dissipation and microbial activity and structure in an agricultural soil: Effect of herbicide rate and organic residues. *Applied Soil Ecology*, 140: 135-143.
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., ... & Schoff, P. K. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455: 1235.
- Römbke, J., Bauer, C., & Marschner, A. (1996). Hazard assessment of chemicals in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 3: 78.
- 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.
- Saier Jr, M. H., & Paulsen, I. T. (2001, June). Phylogeny of multidrug transporters. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 12, No. 3, pp. 205-213). Academic Press.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J. F., & Ribera, D. (1998). Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 602-614.
- Sanchez-Hernandez, J. C. (2006). Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 85-126). Springer, New York, NY.
- Sanchez-Hernandez, J. C., Mazzia, C., Capowiez, Y., & Rault, M. (2009). Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: potential (eco) toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150: 503-511.
- Sanchez-Hernandez, J. C., & Wheelock, C. E. (2009). Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental pollution*, 157: 264-272.

- Santos, A., & Flores, M. (1995). Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 349-352.
- 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.
- Scholz, N. L., Fleishman, E., Brown, L., Werner, I., Johnson, M. L., Brooks, M. L., ... & Schlenk, D. (2012). A perspective on modern pesticides, pelagic fish declines, and unknown ecological resilience in highly managed ecosystems. *BioScience*, 62: 428-434.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., & Treilhou, M. (2008). Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*, 71: 1832-1839.
- Sherratt, P. J., & Hayes, J. D. (2001). Glutathione S-transferases. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*, 319.
- Silva, V., Mol, H. G., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils—A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment*, 653: 1532-1545.
- Sims, R. W., & Gerard, B. M. (1985). *Earthworms: Synopses of the British Fauna No. 31*. The Linnean Society/EJ Brill, London.
- Sokolová, R., Hromadová, M., & Pospíšil, L. (2003). Adsorption of s-triazine pesticides, terbutylazine and atrazine: environmental risk parallels differences in compact film formation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 552: 53-58.
- Song, Y., Zhu, L. S., Wang, J., Wang, J. H., Liu, W., & Xie, H. (2009). DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil biology and biochemistry*, 41: 905-909.
- Sousa, A. P. A. D., & Andréa, M. M. D. (2011). Earthworm (*Eisenia andrei*) avoidance of soils treated with cypermethrin. *Sensors*, 11: 11056-11063.

- Spurgeon, D. J., Ricketts, H., Svendsen, C., Morgan, A. J., & Kille, P. (2005). Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. *Environmental science & technology*, 39: 5327-5334.
- Stenersen, J., Guthenberg, C., & Mannervik, B. (1979). Glutathione S-transferases in earthworms (Lumbricidae). *Biochemical Journal*, 181: 47-50.
- Stenersen, J. (2004). *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC press.
- 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. *Advances in earthworm ecotoxicology*, 67-81.
- Stojanović, M., Karaman, S., & Milutinović, T. (2007). Herbicide and pesticide effects on the earthworm species *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Archives of Biological Sciences (Serbia)*.
- Straathof, H. J. M. (1986). Investigations on the phytotoxic relevance of volatilization of herbicides. In *Internationaal Symposium over Fytofarmacie en Fytiatrie*.
- Tandogan, B., & Ulusu, N. N. (2006). Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31: 230.
- Tejada, M., del Toro, M., Osta, P., Parrado, J., & Gómez, I. (2013). Sorption of terbuthylazine in organic matter amended soils: Effects on *Eisenia Fetida* and *Lumbricus Terrestris*. In *Herbicides-Advances in research*. IntechOpen.
- Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W., & Khan, K. (2018). Ecotoxicological effects of binary mixtures of siduron and Cd on mRNA expression in the earthworm *Eisenia fetida*. *Science of the Total Environment*, 610: 657-665.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64: 178-189.
- 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 der Werf, H. M. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 60: 81-96.

Velki, M. (2014). Comparison of three systems for testing the toxicity of pesticides dimethoate, pirimiphos-methyl and deltamethrin using molecular biomarkers of earthworms (Lumbricidae) (Doctoral dissertation, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

Velki, M., & Hackenberger, B. K. (2012). Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156: 104-112.

Velki, M., & Hackenberger, B. K. (2013a). Different sensitivities of biomarker responses in two epigeic earthworm species after exposure to pyrethroid and organophosphate insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 65: 498-509.

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., Hackenberger, B.K. (2013c) 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., Lončarić, Ž., & Hackenberger, D. K. (2014). Application of microcosmic system for assessment of insecticide effects on biomarker responses in ecologically different earthworm species. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104: 110-119.

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.

Viswanathan, R. (1997). Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms. *Chemosphere*, 35: 323-334.

- Walker, C. H., Sibly, R. M., & Peakall, D. B. (2016). Principles of ecotoxicology. CRC press.
- Wang, X., Zhu, X., Peng, Q., Wang, Y., Ge, J., Yang, G., ... & Shen, W. (2019). Multi-level ecotoxicological effects of imidacloprid on earthworm (*Eisenia fetida*). Chemosphere, 219: 923-932.
- 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.
- Webster, J. P. G., Bowles, R. G., & Williams, N. T. (1999). Estimating the economic benefits of alternative pesticide usage scenarios: wheat production in the United Kingdom. Crop Protection, 18: 83-89.
- Wheelock, C. E., Shan, G., & Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. Journal of Pesticide Science, 30: 75-83.
- Wong, B., & Candolin, U. (2015). Behavioral responses to changing environments. Behavioral Ecology, 26: 665-673.
- World Health Organization. (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.
- Wyszkowska, J., Tomkiel, M., Baćmaga, M., Borowik, A., & Kucharski, J. (2016). Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of pethoxamid terbuthylazine. Environmental Earth Sciences, 75: 1285.
- Xiao, H., Zhou, Q. X., & Liang, J. D. (2004). Single and joint effects of acetochlor and urea on earthworm *Eisenia foelide* populations in phaozem. Environmental geochemistry and health, 26: 277-283.
- Yang, G., Chen, C., Yu, Y., Zhao, H., Wang, W., Wang, Y., ... & Wang, X. (2018). Combined effects of four pesticides and heavy metal chromium (VI) on the earthworm using avoidance behavior as an endpoint. Ecotoxicology and environmental safety, 157: 191-200.

Zarea, M. J. (2010). Conservation tillage and sustainable agriculture in semi-arid dryland farming. In Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture (pp. 195-238). Springer, Dordrecht.

Zarea, M. J., & Karimi, N. (2012). Effect of herbicides on earthworms. *Dynamic soil, Dynamic plant*, 6: 5-13.

Zgurskaya, H. I., & Nikaido, H. (2002). Mechanistic parallels in bacterial and human multidrug efflux transporters. *Current Protein and Peptide Science*, 3: 531-540.

Zhang, Q., Zhu, L., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Han, Y., & Yang, J. (2013). Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 201-208.

WEB IZVORI:

Web 1:

<https://gospodarski.hr/uncategorized/suzbijanje-korova-u-ratarskim-kulturama/7958/>, pristupljeno: 26.7.2019.

Web 2:

<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/7-niches-within-earthworms-habitat>, pristupljeno: 26.7.2019.

Web 3:

http://pinova.hr/hr_HR/katalog-proizvoda/sredstva-za-zastitu-bilja/herbicidi/zemljisni-herbicidi/koban-t, pristupljeno: 30.7.2019.

Web 4:

https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/02_eu_berichte/Pethoxamid-DAR.pdf?__blob=publicationFile&v=2, pristupljeno: 30.7.2019.

