

# Utjecaj pesticida na predstavnike porodice Ranidae (Amphibia, Anura)

---

**Bekić, Bruno**

**Undergraduate thesis / Završni 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:181:081279>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



**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

Preddiplomski sveučilišni studij: Biologija

Bruno Bekić

**Utjecaj pesticida na predstavnike porodice Ranidae  
(Amphibia, Anura)**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Olga Jovanović Glavaš

Osijek, 2019.

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za biologiju**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Biologija

## **Utjecaj pesticida na predstavnike porodice Ranidae (Amphibia, Anura)**

Bruno Bekić

**Rad je izrađen na:** Odjelu za biologiju

**Mentor:** Dr. sc. Olga Jovanović Glavaš, docent

### **Kratak sažetak završnog rada:**

Razred vodozemaca (Amphibia) uključujući i žabe iz porodice Ranidae smatra se jednom od najugroženijih skupina životinja na svijetu. Neki od najčešćih uzroka smanjivanja brojnosti vrsta su globalno zatopljenje, gljivična oboljenja, ali i pesticidi. Nakupljanje pesticida u tlu i ispiranje uslijed poplava ili oborina dovodi do njihovog taloženja u barama i jezerima gdje se žabe razmnožavaju i žive te na taj način pesticidi direktno djeluju na smanjivanje brojnosti vrsta. Zbog sve većeg širenja poljoprivrednih površina dolazi do povećane upotrebe pesticida za koje je dokazano da imaju negativne utjecaje na razmnožavanje, razvoj, rast i ponašanje žaba. U ovom radu istraženo je djelovanje pesticida na porodicu Ranidae te je dokazano da u određenim koncentracijama uzrokuju fiziološke i morfološke promjene punoglavaca i odraslih jedinki te da je njihova povećana upotreba jedan od razloga smanjivanja brojnosti žaba u svijetu.

**Broj stranica:** 17

**Broj slika:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 17

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** žabe, punoglavci, ugroženost

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Biology**

**Undergraduate university study programme in Biology**

**Scientific Area:** Natural sciences

**Scientific Field:** Biology

**Influence of pesticides on representatives of family Ranidae (Amphibia,  
Anura)**

Bruno Bekić

**Thesis performed at:** Department of Biology

**Supervisor:** Dr. sc. Olga Jovanović Glavaš, assistant professor

**Short abstract:**

Class Amphibia, including frogs of family Ranidae are considered one of the most endangered animal groups in the world. Some of the most common causes of their decline are global warming, fungal diseases and pesticides. Accumulation of pesticides in the soil and their run-off due to floods or precipitation lead to their deposition in ponds and lakes where frogs reproduce and live, so pesticides thus directly affect the species number. Due to the expansion of agricultural areas, increased use of pesticides has been shown to have adverse effects on reproduction, development, growth and behavior of frogs. This study investigates the effects of pesticides on the family Ranidae, and shown that at certain concentrations pesticides cause physiological and morphological changes in tadpoles and adult individuals and that their increased use is one of the reasons for the decline of frogs in the world.

**Number of pages:** 17

**Number of figures:** 6

**Number of references:** 17

**Original in:** Croatia

**Key words:** frogs, tadpoles, threat

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

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Pesticidi .....	1
<b>2. TEMATSKI DIO</b> .....	2
2.1. DDT I DDE .....	2
2.2. Atrazin .....	4
2.3. Endosulfan.....	6
2.4. Glifosat .....	8
2.5. Parakvat .....	9
2.6. Klorpirifos .....	12
2.7. Ostali pesticidi .....	13
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	14
<b>4. LITERATURA</b> .....	15

# 1. UVOD

Porodica Ranidae (prave žabe) pripada razredu Amphibia (vodozemci) te je jedna od najraširenijih porodica žaba na svijetu. Prisutna je na svim kontinentima osim na Antarktici. Predstavnici ove porodice imaju tanku i glatku kožu, veličine su od 5-30 cm, većina vrsta su skakači (firmisternia) te imaju rožnate zube u donjoj čeljusti. Eksplozivno se razmnožavaju u jezerima i barama nakon otapanja snijega u proljeće, imaju vanjsku oplodnju, a ženke polažu u vodu nekoliko stotina jaja koja zatim mužjaci oplođuju. U Hrvatskoj su najčešće vrste livadna smeđa žaba (*Rana temporaria*), jestiva zelena žaba (*Pelophylax kl. esculentus*), velika zelena žaba (*Pelophylax ridibundus*) te šumska smeđa žaba (*Rana dalmatina*). Općenito, vodozemci, odnosno žabe, se smatraju jednom od najugroženijih skupina organizama na svijetu, a među kralježnjacima su najugroženija skupina. Prema podacima iz 2004. godine pretpostavlja se da je u svijetu 32 % vodozemaca ugroženo, a za 43 % svih vrsta se bilježi smanjenje brojnosti (Stuart i sur. 2004). Ta se brojka 2010. povećala na preko 70 % vrsta ugroženih vodozemaca u svijetu (Hayes i sur. 2010). Njihov način i ciklus života te propusna koža uvelike doprinose tome da zagađenje okoliša direktno utječe na smanjivanje brojnosti vrsta. Neki od glavnih razloga njihovog nestajanja i smanjivanja populacija su klimatske promjene uzrokovane globalnim zatopljenjem, pojačano UV-zračenje, utjecaj čovjeka na okoliš (krčenje šuma, povećanje obradivih poljoprivrednih površina, urbanizacija), kompeticija za prostor i hranu, pojava virusnih i gljivičnih oboljenja kod žaba (hitridiomikoza) te unos stranih vrsta. Također zbog povećanja obradivih površina dolazi do sve veće upotrebe pesticida koji se koriste za suzbijanje određenih štetnika, ali i kao sredstvo protiv korova (Leiva-Presa i Jenssen 2006).

## 1.1. Pesticidi

Pesticidi su tvari kemijskog ili biološkog porijekla koje se koriste za selektivno suzbijanje štetnih organizama u prirodi. Prema kemijskom sastavu pesticidi se dijele na: neorganske tvari koje potječu iz biljaka, bakterija i gljiva, i organske sintetske tvari kojima pripadaju organoklorirani pesticidi (DDT, endosulfan), organofosfatni pesticidi (glifosat, klorpirifos), triazini (atrazin, cijanazin), neonikotinoidi, piretroidi (esfenvalerat), bipiridini (parakvat) i dr. Ovisno o namjeni pesticide dijelimo u podgrupe od kojih su najviše

zastupljeni herbicidi (za tretiranje korova), insekticidi (za kukce) te fungicidi (gljivična oboljenja). Pesticidi mogu izrazito štetno djelovati na žabe te je dokazano da nakupljanje i primjena pesticida u okolišu mogu imati negativne utjecaje na rast, razmnožavanje, razvoj, imuni odgovor i ponašanje punoglavaca i odraslih žaba. Također je dokazano da izlaganje pesticidima u dopuštenim koncentracijama može uzrokovati feminizaciju mužjaka žaba (Hayes i sur. 2003). Glavnina štetnosti pesticida dolazi od toga da se pretjeranim korištenjem u prirodi oni nakupljaju u tlu. Djelovanjem čovjeka, oborinama ili nekim drugim postupcima, pesticidi se talože u okolnim jezerima, rijekama i barama u kojima se žabe razmnožavaju te tako štetno djeluju kako na same žabe tako i na punoglavce koji se nalaze u njima. Većina dosadašnjih studija bazirala se na utjecaju pesticida na ciljne vrste, kao na primjer komarce ili štetnike usjeva, jer njihova otpornost na pesticide može predstavljati ozbiljne zdravstvene i ekonomske probleme (Mallet 1989). No istraživanja na drugim skupinama organizama, poput vodozemaca, nisu bila od prevelike važnosti iako su upravo vodozemci najugroženiji zbog upotrebe pesticida. Također, vodozemci su često kolateralne žrtve djelovanja pesticida što na kraju dovodi do smanjenja njihove brojnosti u prirodi.

Cilj ovog rada bio je istražiti kakav učinak pesticidi imaju na predstavnike porodice Ranidae te je li njihova upotreba uistinu jedan od razloga smanjivanja brojnosti vodozemaca u svijetu.

## **2. TEMATSKI DIO**

### **2.1. DDT I DDE**

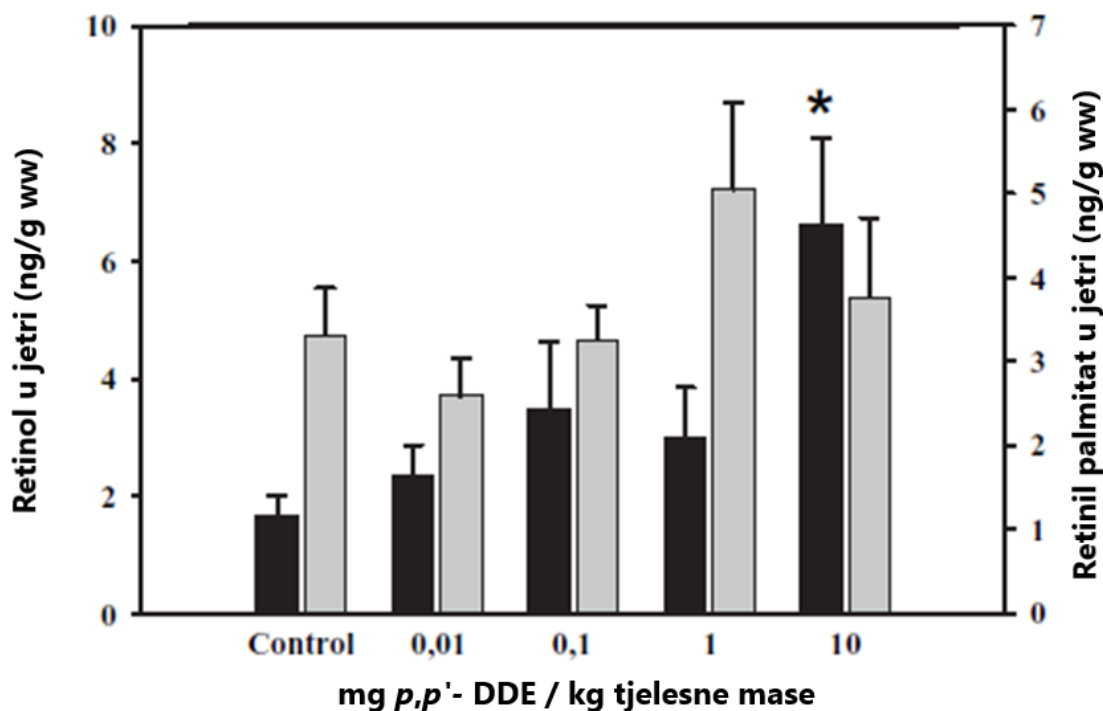
DDT (diklor-difenil-trikloretnan) predstavnik je organokloriranih pesticida koji se koristio u svijetu između 1940. i 1960. kao insekticid u poljoprivredi, ali i za suzbijanje komaraca koji su prenosili malariju i tifus. Dugo vremena bio je prezentiran kao apsolutno neškodljiv, a kasnije je utvrđen cijeli niz štetnih učinaka na ljudski organizam uslijed njegove primjene. U većini država, DDT je zabranjen početkom 1970.-ih zbog taloženja u mišićima i kostima, ali i nakupljanju u organima bogatim mastima, kao npr. nadbubrežnim žlijezdama, štitnjači i sjemenicima, pronađen je i u majčinom mlijeku te je uzrokovao smrtnost nekih vrsta predatorskih ptica. Godine 2001. dolazi do globalne zabrane upotrebe DDT-a, osim u državama u razvoju kojima je to dopušteno radi zaštite od malarije. No, kako mnogi pesticidi

moгу ostati aktivni u prirodi i po nekoliko godina, čak i desetljeća, tako se i DDT održao u okolišu te su ga stručnjaci nalazili prisutnog kod životinja, a pronašli su tragove čak i na Antarktiku. Istraživanja provedena o utjecaju DDT-a na predstavnike Ranidae rađena su 70.-ih i 80.-ih godina prošlog stoljeća. Utvrđeno je da izloženost na manjim vodenim površinama pri visokoj koncentraciji DDT-a dovodi do odgođene metamorfoze punoglavaca te su razvijeni punoglavci bili značajno deformirani. S druge strane, izloženost ovom pesticidu na većim vodenim površinama, gdje je potrebno duže vremensko razdoblje za akumulaciju pesticida u tkivo organizma, dovodi do veće stope metamorfoze punoglavaca. Rezultati istraživanja su također pokazali da kratkotrajna izloženost DDT-u dovodi do hiperaktivnosti koja uzrokuje gubitak mase i usporenost u razvoju (Cooke 1973).

DDE (diklor-difenil-dikloroetilen) produkt je raspadanja DDT-a, odnosno nastaje uklanjanjem klorovodika procesom dehidrohalogeniranja. Kao i DDT-a, ostaci ovog pesticida također se mogu pronaći u močvarama i tlu. Većina studija bazirala se na utjecajima tog pesticida na rane stadije u razvoju žabe (jaja i punoglavci), dok u suprotnom, vrlo malo ima studija o djelovanju DDE-a na odrasle jединke. Leiva-Presa i Jenssen (2006) su proveli eksperiment u kojem su istražili utjecaj DDE pesticida na endokrini sustav kod mužjaka odrasle livadne smeđe žabe (*Rana temporaria*). Livadna smeđa žaba bila je izložena različitim subletalnim koncentracijama DDE-a (99.5 % čistoće) pomiješanim s kukuruznim uljem (0, 0.01, 0.1, 1 i 10 mg DDE/kg tjelesne mase) u periodu od 14 dana. Kontrolna grupa bila je tretirana samo kukuruznim uljem. Nakon 14 dana mjerili su razinu spolnih hormona (testosteron i 17  $\beta$ -estradiol) u plazmi, masu spolnih žlijezda te koncentraciju retinoida (retinol i retinil palmitat). Retinol, koji se još naziva i vitamin A1, esencijalni je nutrijent u organizmu te ima važnu ulogu u održavanju normalnog vida, diferencijaciji epitelnih stanica i sluznice, razmnožavanju te funkciji imunog sustava. Samim time, djelovanje pesticida na retinol može bitno utjecati na rast, razvoj i razmnožavanje vodozemaca. Rezultati su pokazali da se koncentracija retinola u jetri odrasle žabe *Rana temporaria* povećavala s povećanjem koncentracije DDE-a, dok se retinil palmitat nije previše razlikovao u odnosu na tretirane žabe. Razine spolnih hormona nisu se značajno promijenile djelovanjem DDE-a te je masa spolnih žlijezda bila u skladu s kontrolnom grupom. Do povećanja koncentracije retinola došlo je zbog toga što se metabolizam samog retinoida odvija putem oksidacije enzimom citokrom P-450 (CYP450). Uslijed toga, DDE uzrokuje redukciju aktivnosti jetrenog CYP450 enzima koji smanjuje metabolizam retinola u jetri, što za posljedicu ima povećanje koncentracije retinola u jetri (Slika 1). Zaključili su da DDE nema značajnog utjecaja na spolne hormone kod vrste *R. temporaria* te su podaci pokazali da su odrasle žabe



relativno tolerantne na pesticide koji uzrokuju poremećaj endokrinog sustava. No, pokazalo se da pri koncentraciji od 10 mg DDE/kg tjelesne mase dolazi do promjene koncentracije retinoida, vrlo vjerojatno zbog djelovanja na metabolizam retinola. Kako je homeostaza retinola izrazito bitna za razmnožavanje i rast žaba, postoji mogućnosti da pesticid DDE ima utjecaj na smanjenje populacija žaba u svijetu.

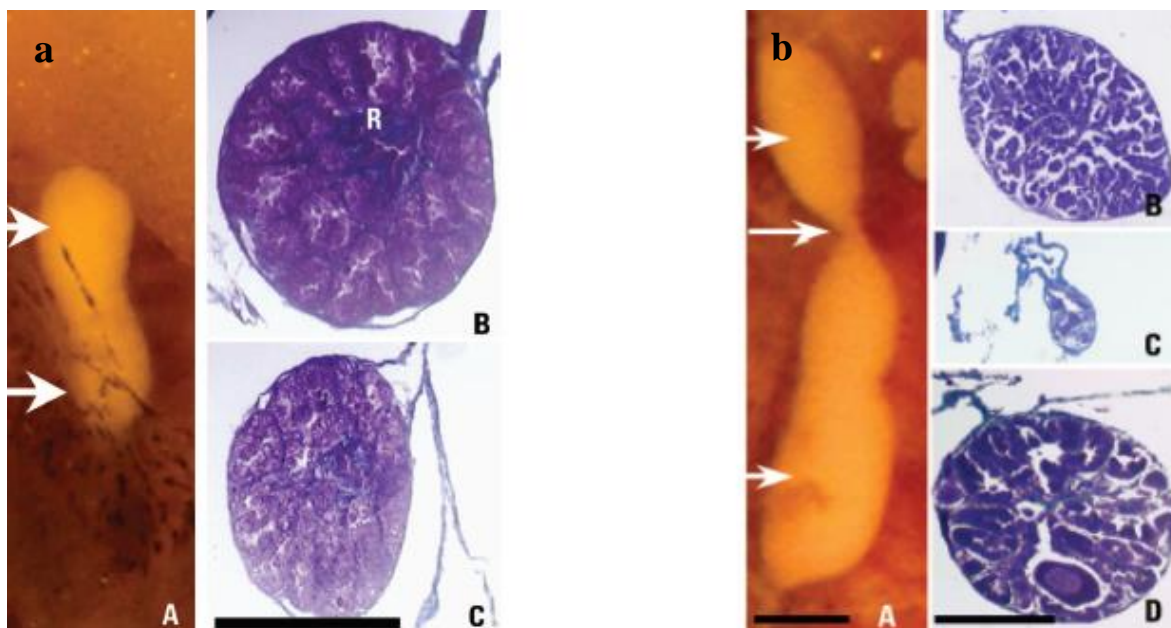


**Slika 1.** Grafički prikaz koncentracije retinola (crni stupci) i retinil palmitata (sivi stupci) u jetri odrasle žabe *R. temporaria* tretirane s 0, 0.01, 0.1, 1 i 10 mg DDE/kg tjelesne mase. (Preuzeto i prilagođeno prema Leiva-Presa i Jenssen 2006)

## 2.2. Atrazin

Atrazin ili 2-kloro-4-(etilamin)-6-(izopropilamin)-*S*-triazin pripada skupini triazinskih herbicidnih pesticida. Jedan je od najčešće korištenih herbicida u SAD-u, ali i u svijetu te je prisutan u velikim količinama u zemlji i površinskim vodama. Otporan je i štetan za organizme, a vrlo često ga se može pronaći u staništima gdje obitavaju ribe i vodozemci. Ima različite učinke na slatkovodne organizme, pa je tako dokazano da utječe na promjene ponašanja i obrasce hranjenja, izbjegavanje predatora, ali i dovodi do isušivanja kože

vodozemaca. Isto tako, utječe na rast i vrijeme metamorfoze vodozemaca, a otkriveno je i da atrazin dovodi do smanjenja imuniteta kod žaba (Rohr i sur., 2003). Hayes i sur. (2003) su istražili djelovanje atrazina na razvoj spolnih žlijezda u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i u prirodnim staništima na jedinke sjeverne leopard žabe (*Lithobates pipiens*). Pokus u kontroliranim uvjetima su provodili na 30 jedinki punoglavaca koje su tretirali s 0, 0.1 i 25 ppb atrazina pomiješanog s etanolom. Nakon njihove metamorfoze, odnosno nestanka repa, svaka jedinka je vagana i mjerena te eutanazirana za daljnja istraživanja. Iz prirode je uzorkovano 800 jedinki na 8 različitih lokacija od kojih je kod 20 mužjaka i ženki provedena histološka analiza djelovanja atrazina na spolne žlijezde, a uzorkovane su na područjima s upotrebom atrazina manjoj od 0.4 kg/km<sup>2</sup> te upotrebom od 0.4-2.4 kg/km<sup>2</sup>. Rezultati na muškim jedinkama u laboratorijskim uvjetima su pokazali da je dio kontrolne skupine kod koje je došlo do ranije metamorfoze imala dobro razvijene režnjiće sjemenika te primarne spermatogonije, dok je skupina s kasnijom metamorfozom imala otvorene režnjiće sjemenika koji su sadržavali primarne spermatogonije i spermatide (Slika 2a). Ženke su imale razvijene jajnike i oocite te nije uočena promjena jajnika djelovanjem atrazina. Kod mužjaka koji su tretirani s 0.1 i 0.25 ppb atrazina također je došlo do razvoja sjemenika, ali 12% jedinki je imalo nedovoljno razvijene sjemenike sa slabo strukturiranim, zatvorenim lobulima tj. režnjićima. Nadalje, 29 % jedinki tretiranih s 0.1 ppb atrazina i 8 % tretiranih s 25 ppb su pokazivali određeni stupanj hermafroditizma, odnosno, u sjemenicima su pronađene oocite (Slika 2b). Nekoliko mužjaka je isto tako imalo sjemenike gotovo u potpunosti ispunjene s oocitama. Na jedinkama skupljenima iz prirode je također istražen razvoj spolnih žlijezda te je otkriveno da na svim područjima gdje je upotreba atrazina prelazila 0.4 kg/km<sup>2</sup>, odnosno 0.2 ppb došlo do nekog oblika poremećaja. Temeljem obrade rezultata dokazano je da izlaganje atrazinu u koncentraciji većoj od 0,1 ppb dovodi do razvoja abnormalnih spolnih žlijezda i oogeneze u sjemenicima, odnosno hermafroditizma kod mužjaka sjeverne leopard žabe.

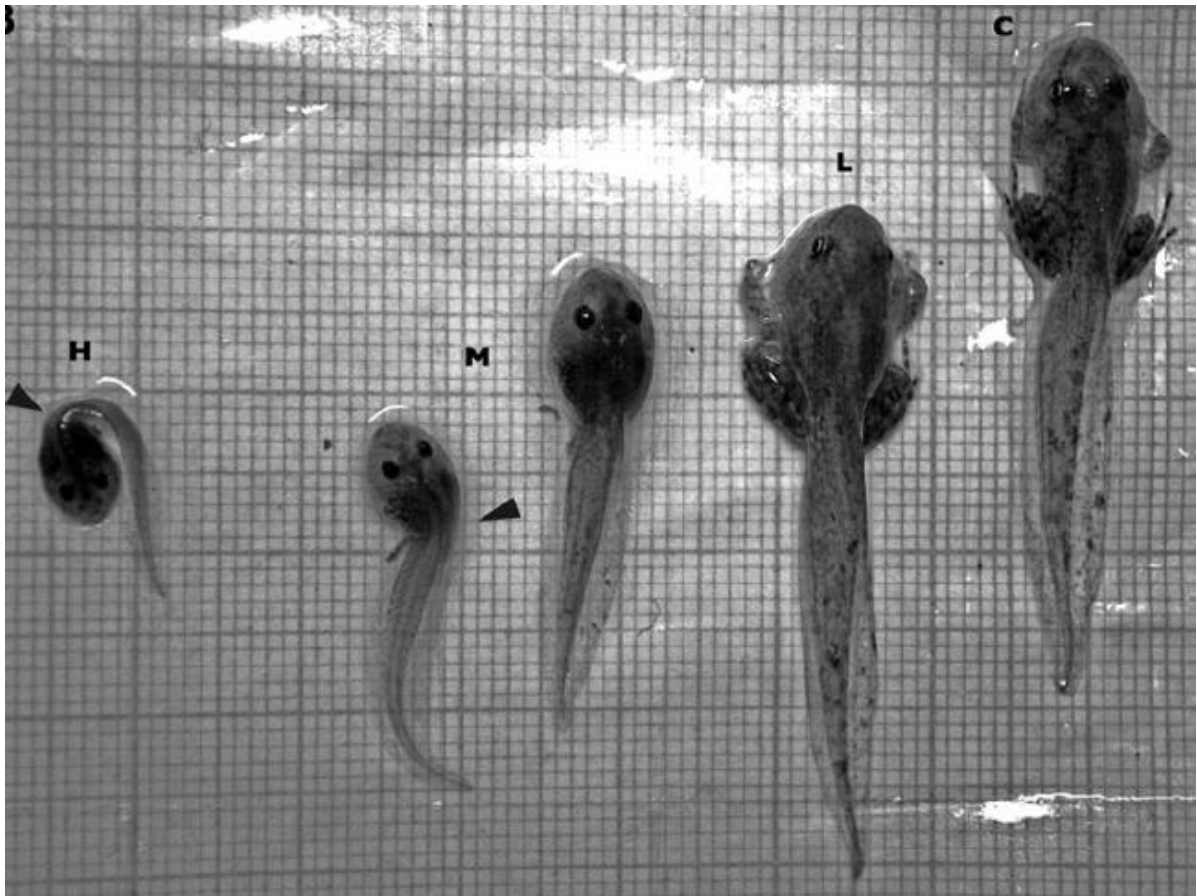


**Slika 2.** Sjemenci kontrolne skupine mužjaka *L. pipiens* (a). (A) Sjemenci su i dalje prihvaćeni za bubreg. Bijele strelice prikazuju mjesto poprečnog presjeka u (B) i (C). Režnjići su bili dobro razvijeni. R=sjemenik. Skala= 1.0 mm za (A) i (B) te 250  $\mu\text{m}$  za (C). Sjemenic mužjaka *L. pipiens* tretiranog s 0.1 ppb atrazina (b). (A) Prikaz sjemenika. Strelice pokazuju područja gdje su uzeti poprečni presjeci; skala= 250  $\mu\text{m}$ . (B) Prednji dio; režnjići sjemenika su otvoreni i sadrže spermatide. (C) Centralni dio, sadrži tri režnjića. (D) Stražnji dio; jedan režnjić sadrži veliku jajnu stanicu. Skala= 100  $\mu\text{m}$  za (B-D) (Preuzeto i prilagođeno prema Hayes i sur. 2003)

### 2.3. Endosulfan

Endosulfan pripada skupini organokloriranih insekticida koji djeluje kao kontaktni otrov za suzbijanje insekata i grinja. Isto tako, može se koristiti kao sredstvo za zaštitu drva, a najčešće se primjenjuje na prehrambenim usjevima poput žitarica, biljkama čaja, voća i povrća. Netopljiv je u vodi te je označen kao perzistentni organski zagađivač, odnosno dugotrajno se zadržava u okolišu te utječe na ljudsko zdravlje. No, u zemljama u razvoju se i dalje intenzivno koristi i primjenjuje. Proveden je veliki broj studija o štetnosti djelovanja endosulfana na predstavnike Ranidae, a jedna on njih je istraživala akutne i kronične utjecaje ovog insekticida na punoglavce šumske smeđe žabe (*Rana dalmatina*) nakon izlaganja ekološki relevantnim koncentracijama od 0.01 i 0.05 mg endosulfana/L upotrebom video tehnike za praćenje pokreta i ponašanja punoglavaca. Pri akutnoj izloženosti od 96 h ustanovljeno je da je koncentracija pri kojoj 50% punoglavaca umire tj.  $LC_{50}$  za endosulfan 0.074 mg/L te je utvrđeno da u ostalim koncentracijama nije došlo do morfoloških promjena.

Kronična izloženost trajala je 56 dana pri koncentracijama 0.01 i 0.05 mg endosulfana/L te su rezultati pokazali da ekološki relevantne koncentracije između 0.01 i 0.05 mg/L uzrokuju usporeni rast punoglavaca, odgađanje metamorfoze i povećanje smrtnosti. Isto tako, endosulfan je doveo do ozbiljnih deformacija skeleta, asimetričnosti repa i otečenosti glave (Slika 3). Također, video analiza je pokazala da pri navedenim koncentracijama kod punoglavaca dolazi do promjene u načinu plivanja kao što su smanjena aktivnost, povećanje odmora i neuobičajeno kretanje u prostoru (Lavorato i sur. 2013).

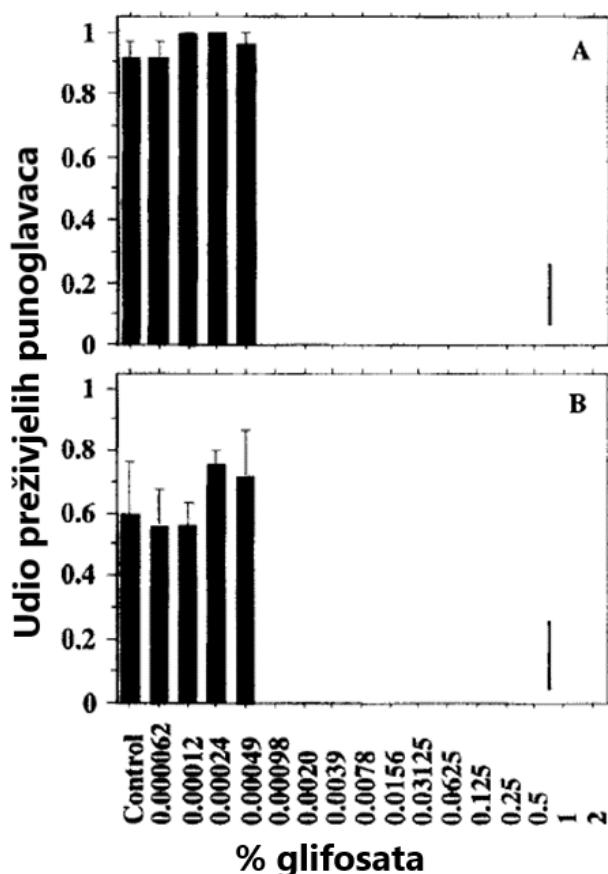


**Slika 3.** Dorzalni prikaz razvojnog stadija punoglavaca *R. dalmatina* izloženih endosulfanu i kontrolne skupine nakon 49 dana. Strelice prikazuju deformacije skeleta kod H i M skupine. (C=0 mg endosulfan/L; L= 0.005 mg endosulfan/L; M= 0.01 mg endosulfan/L; H= 0.05 mg endosulfan/L) (Preuzeto i prilagođeno prema Lavorato i sur. 2013)

## 2.4. Glifosat

Glifosat ili (*N*-fosfonometil glicin) jedan je od najkorištenijih herbicida u svijetu. Pripada skupini organofosfatnih pesticida te se koristi za suzbijanje korova u poljoprivredi. Djeluje neselektivno na biljke, što znači da ne uništava samo korov nego i usjeve pa se iz tog razloga primjenjuje kod genetički modificiranih usjeva koji su otporni na djelovanje glifosata. Uništava biljke tako da inhibira produkciju esencijalnih aromatskih kiselina tj. inhibira 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintazu (EPSP sintaza). Dokazano je da negativno djeluje na žabe tako što uzrokuje promjene u ponašanju. Jedan od najpoznatijih pesticida baziranog na glifosatu je RoundUp. RoundUp sadrži dvije glavne komponente, a to su već spomenuti glifosat i surfaktant polietoksilirani talovamin ili POEA. POEA olakšava prodiranje glifosata u kutikularni sloj biljke. Perkins i sur. (2000) su otkrili da je glifosat u kombinaciji sa surfaktantom POEA 700 puta toksičniji nego bez njega, a vjeruje se da je uzrok tomu povećanje apsorpcije glifosata uz prisustvo surfaktanta ili sinergističko djelovanje ove dvije komponente na organizme. Comstock i sur. (2007) su istražili toksičnost RoundUp herbicida na punoglavcima šumske žabe (*Lithobates sylvaticus*). Punoglavci su tretirani različitim koncentracijama herbicida te je utvrđeno da su svi punoglavci izloženi koncentraciji većoj od 0.00098 % glifosata uginuli unutar 24 sata. S druge strane utvrđeno je da su punoglavci izloženi koncentracijama manjim od 0.00049 % većinom preživjeli te je dokazano da dugotrajnija izloženost dovodi do većeg mortaliteta punoglavaca (Slika 4). Ova studija je dokazala da bilo kakva aplikacija ovog herbicida u vodenim sustavima ima utjecaj na punoglavce. Istraženo je i imaju li pesticidi utjecaja na obranu i izbjegavanje predatora u prirodi, a jedan takav pokus su proveli Mikó i sur. (2017). Njime su htjeli utvrditi postoji li veza između djelovanja herbicida na bazi glifosata i prisutnosti predatora na ponašanje punoglavaca šumske smeđe žabe (*Rana dalmatina*). Kako bi utvrdili to, punoglavce su tretirali koncentracijama od 0, 2 i 6.5 mg/L glifosata uz prisustvo ili odsustvo predatora. Postavljena je kontrolna skupina bez predatora, zatim skupina s ličinkama modrog kralja (*Aeshna cyanea*) te skupina s odraslim mužjacima malog vodenjaka (*Lissotriton vulgaris*). Promatrana je aktivnost i skrivanje punoglavaca, izbjegavanje predatora te njihov vertikalni položaj u vodi tijekom dvadeset i jednog dana. Rezultati su pokazali značajno smanjenje aktivnosti pri višim koncentracijama herbicida u odnosu na kontrolnu skupinu, dok, pri nižim koncentracijama nije uočena promjena. Isto tako, pri većim koncentracijama herbicida punoglavci su se više skrivali nego u njegovoj odsutnosti, a pri nižim koncentracijama nije uočena promjena. Izloženost herbicidu uvelike je utjecalo na vertikalno kretanje

punoglavaca, pri manjim koncentracijama punoglavci su se kretali prema površini vode zbog toga što je sama koncentracija herbicida veća u nižim slojevima vode. Povezanost između djelovanja herbicida i izbjegavanja predatora nije uočena.



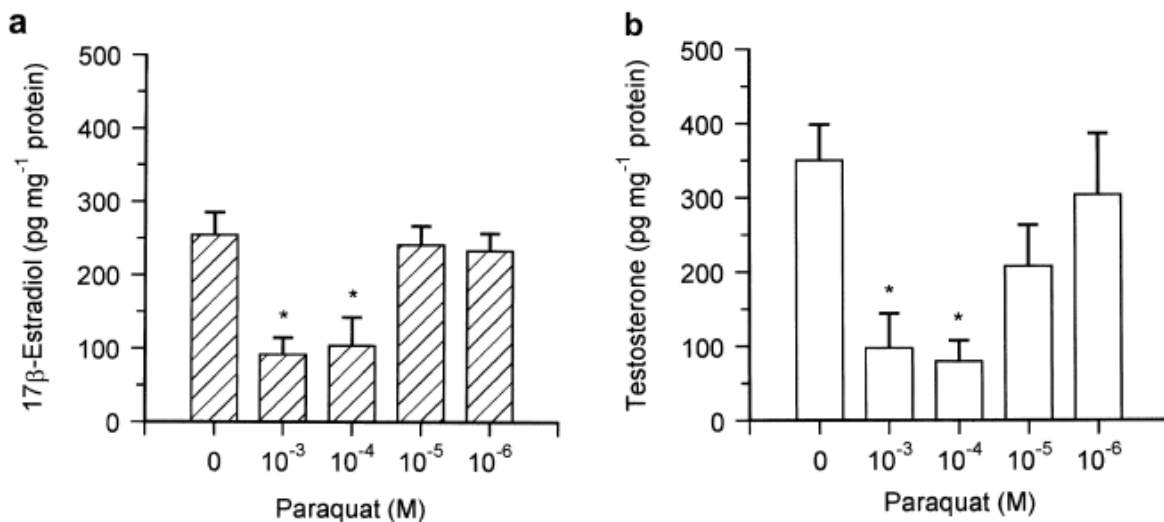
**Slika 4.** Grafički prikaz udjela preživjelih punoglavaca *L. sylvaticus* pri različitim koncentracijama RoundUp herbicida. (A) 24 h, (B) 96 h (Preuzeto i prilagođeno prema Comstock i sur. 2007)

## 2.5. Parakvat

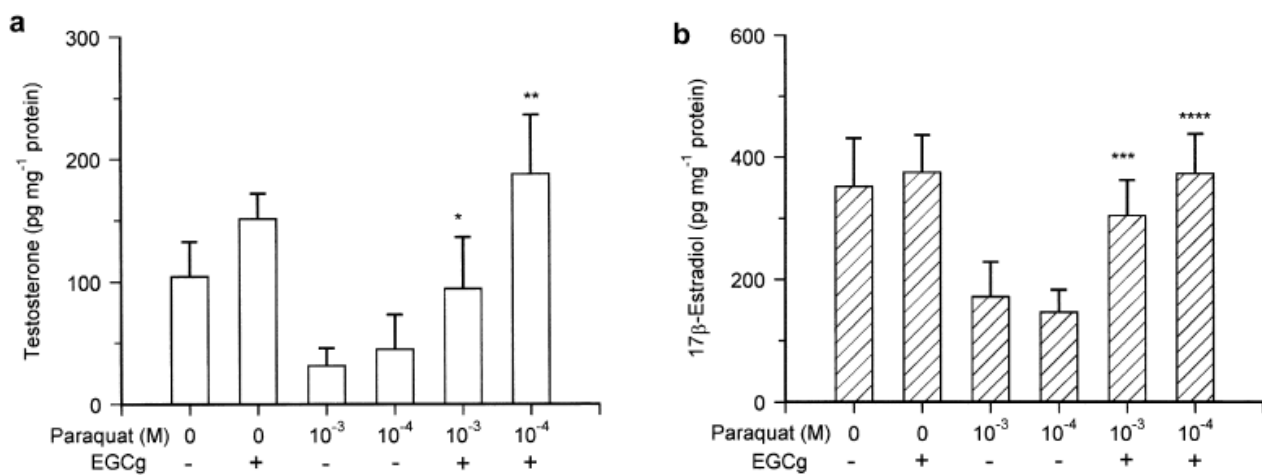
Parakvat ili (1-1'-diethyl-4,4'-bipyridil diklorin) pripada skupini bipiridnih herbicida sa širokim spektrom aktivnosti, djeluje već nakon nekoliko minuta od primjene te uništava sva biljna tkiva. Uzrokuje smrt biljaka tako što ometa intercelularni transport elektrona, odnosno inhibira redukciju NADP u NADPH tijekom fotosinteze. Uslijed toga, dolazi do stvaranja superoksidnih aniona, singletnog kisika kao i hidroksilnih i peroksidnih radikala. Tako

nastale reaktivne kisikove vrste (ROS) međusobno djeluju s nezasićenim lipidima membrana uzrokujući uništavanje biljnih organela, a na kraju i smrt biljke. Poznato je i da je otrovan za ljude i životinje, a kod žaba uzrokuje usporeni rast, iskrivljenost kralježnice, smanjenje aktinskih vlakana u mišićima kao i njegovo nakupljanje u neuromelaninu. Također, može dovesti do inhibicije sinteze spolnih hormona u sjemenicima i jajnicima žaba. Mehanizam njegovog djelovanja je da dovodi do stvaranja superoksidnih aniona koji zatim uzrokuju nastanak toksičnijih reaktivnih kisikovih vrsta kao što je hidrogen peroksid. Na kraju dolazi do oksidacije staničnog NADPH koji ima ulogu u redukciji parakvata. Jedan takav pokus su proveli Quassinti i sur. (2008) u kojemu su izložili muške i ženske spolne žlijezde zelene žabe (*Pelophylax kl. esculentus*) različitim koncentracijama parakvata u *in vitro* uvjetima te su mjerili produkciju testosterona i 17  $\beta$ -estradiola. Pokus je bio podijeljen u dvije grupe u kojoj su kod jedne koncentracije parakvata bile  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M i  $10^{-6}$  M, a u drugoj iste koncentracije parakvata uz dodatak epigalokatehin galata (EGCg) pri koncentraciji od  $10^{-3}$  M i  $10^{-4}$  M. Rezultati su u prvom dijelu pokusa pokazali da parakvat uzrokuje značajnu inhibiciju produkcije testosterona kao i 17  $\beta$ -estradiola pri koncentraciji od  $10^{-3}$  M i  $10^{-4}$  M, a u ostalim tretmanima nije došlo do značajnije promjene (Slika 5). U drugom dijelu je dokazano da EGCg, koji ima antioksidativno djelovanje i uklanja aktivne kisikove radikale, poništava inhibicijski učinak parakvata na proizvodnju spolnih hormona (Slika 6). Kako redukcijom parakvata dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje su izrazito štetne za organizam tako je organ koji je na najvećem udaru ovog pesticida jetra. Jetra je organ u kojemu se nalazi antioksidativni enzimatski sustav bitan za uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta. Pa su tako, Czarniewska i sur. (2003) istražili kakav utjecaj ima parakvat na aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPX) i glutation reduktaze (GR) u jetri zelene žabe (*Pelophylax kl. esculentus*). Pesticid je zajedno s ringerovom otopinom ubrizgivan u limfne čvorove zelenih žaba svakodnevno tijekom 6 i 12 dana u dozi od 3 mg/kg tjelesne mase. Kontrolna grupa žaba primala je samo doze ringerove otopine. Nakon 6 i 12 dana jetra je odstranjena iz žaba, vagona te homogenizirana za daljnje analize. Rezultati su pokazali da je nakon 6 dana tretmana parakvatom došlo do smanjenja aktivnosti SOD, CAT i GR, dok se aktivnost GPX nije znatno promijenila. Aktivnost CAT se najviše smanjila i to za 50 % u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 12 dana, aktivnost SOD se nije značajno promijenila, dok se aktivnost GPX i GR smanjila, a CAT značajno povećala. Povećanje aktivnosti CAT nakon 12 dana ukazuje na to da je katalaza glavni enzim za razgradnju hidrogen peroksida nastalog redukcijom parakvata u

organizmu. Uočena je i povećana koncentracija proteina topljivih u vodi zbog oksidativnog stresa u organizmu koji je uzrokovao parakvat.



**Slika 5.** Grafički prikaz produkcije 17 β-estradiola (a) i testosterona (b) u spolnim žlijezdama P. kl. *Esculentus* pri različitim koncentracijama parakvata. (Preuzeto i prilagođeno prema Quassinti i sur. 2008)



**Slika 6.** Grafički prikaz produkcije 17 β-estradiola (a) i testosterona (b) u spolnim žlijezdama P. kl. *Esculentus* pri različitim koncentracijama parakvata uz dodatak EGCg. (Preuzeto i prilagođeno prema Quassinti i sur. 2008)



## 2.6. Klorpirifos

Klorpirifos pripada skupini organofosfatnih insekticida te je jedan od najkorištenijih insekticida u poljoprivredi predstavljajući tako veliku opasnost za vodozemce i općenito vodene ekosustave uslijed proljetnog otapanja leda i snijega, poplava, ali i kiša koje ispiru insekticid iz tla te on dospjeva u vodene sustave gdje se razmnožavaju vodozemci. Poznato je da kod kralježnjaka uzrokuje disfunkciju jetre, poremećaje imunosnog sustava te neurološke promjene. O utjecaju na predstavnike Ranidae zna se izrazito malo. Tako su Bernabó i sur. (2011) istražili utjecaje akutne i kronične izloženosti klorpirifosa na punoglavcima šumske smeđe žabe (*Rana dalmatina*). Rezultati su pokazali da je pri akutnoj izloženosti klorpirifosu tijekom 96 sata letalna koncentracija,  $LC_{50}$  (koncentracija pri kojoj 50 % jedinki ugiba) jednaka 5.174 mg/L. U drugom dijelu pokusa, punoglavci su tretirani koncentracijama klorpirifosa od 0.025, 0.05 i 0.1 mg/L tijekom 57 dana kako bi se utvrdio njegov utjecaj na smrtnost, rast, morfološke promjene i metamorfozu punoglavaca. Nije uočena značajna razlika između tretiranih i netretiranih punoglavaca u postotku smrtnosti ili broju metamorfoziranih jedinki, kao ni u dužini tijela. S druge strane, nakon 35. dana uočene su značajne morfološke promjene na punoglavcima u vidu iskrivljenja kralježnice i repa te otečenosti glave. Također je došlo i do poremećaja u načinu plivanja i kretanja punoglavaca u vodi. Istražen je i kronični utjecaj klorpirifosa na škrge *R. dalmatina* te su rezultati pokazali da pri koncentracijama od 0.05 i 0.1 mg/L dolazi do strukturnih promjena na škragama koje se očituju povećanjem intercelularnog prostora i degradacijom epitelnim stanica. U drugom radu koji su objavili Bernabó i sur. (2011) istražili su utjecaj klorpirifosa na razvoj spolnih žlijezda kod vrste *R. dalmatina*. Punoglavci su tretirani konc. od 0.025 i 0.05 mg/L klorpirifosa tijekom ličinačkog stadija sve do kraja metamorfoze. Nakon tretmana, spolne žlijezde su odstranjene iz tijela jedinki te su odrađene morfološke i histološke analize. U kontrolnoj skupini jajnici i sjemenici su se razvili normalno, dok su u tretiranim grupama uočene oocite u sjemenicima. Izlaganje klorpirifosu tijekom cijelog vremena trajanja pokusa nije dovelo do promjene spola jedinki, ali je dovelo do smanjenja broja mužjaka s normalno razvijenim sjemenicima. Navedeni rezultati ukazuju na to da izlaganje klorpirifosu ima značajan utjecaj na razvoj spolnih žlijezda te da može dovesti do nekog oblika hermafroditizma kod mužjaka *R. dalmatina*.

## 2.7. Ostali pesticidi

Neki od ostalih vrlo često korištenih pesticida u svijetu za suzbijanje štetnika i korova u poljoprivredi i gospodarstvu su azoksistrobin, cijanazin, esfenvalerat, MCPA, permetrin, pirimikarb itd. Johansson i sur. (2005) istražili su utjecaj ovih šest često korištenih pesticida na punoglavce livadne smeđe žabe (*Rana temporaria*). Akutni test koji se provodio pri visokim koncentracijama pesticida tijekom 72 sata pokazao je da cijanazin ima najnegativniji utjecaj na rast punoglavaca, zatim pirimikarb, dok ostala četiri pesticida imaju izrazito malo ili nimalo utjecaja na rast punoglavaca. Smrtnost je generalno bila relativno mala u odnosu na kontrolu, a valja istaknuti azoksistrobin, permetrin i pirimikarb kod kojih je utvrđena slaba, ali značajna smrtnost. Kod ostalih pesticida nije dokazan utjecaj na povećanje smrtnosti punoglavaca. Kronična izloženost pesticidima trajala je od fertilizacije do metamorfoze punoglavaca koji su bili tretirani azoksistrobinom, cijanazinom i permetrinom pri koncentracijama koje su približno jednake onima prisutnim u prirodi. Rezultati su pokazali da pri niskim koncentracijama nije došlo do povećane smrtnosti ili oslabljenog rasta. No, pozitivan utjecaj je dokazan kod permetrina koji je doveo do povećanog rasta punoglavaca tijekom metamorfoze. Navedeni rezultati upućuju na to da ovih šest pesticida može dovesti do ozbiljnih negativnih posljedica pri visokim koncentracijama, ali da imaju izrazito mali utjecaj na punoglavce *R. temporaria* pri niskim koncentracijama kakve su zapravo u prirodi. Nadalje, linuron i S-metolaklor su također jedni od vrlo često korištenih herbicida u svijetu. Linuron je selektivni herbicid koji pripada skupini pesticida na bazi uree. Djeluje tako što inhibira fotosintezu uništavajući fotosustav II te na taj način uzrokuje brzu smrt stanica biljaka. S-metolaklor pripada skupini kloroacetamidnih herbicida, smanjuje stopu klijanja sjemenki u zemlji inhibicijom diobe stanica i njihovog rasta. Izrazito je malo poznato o njihovim djelovanjima na punoglavce porodice Ranidae te su u tu svrhu Quintaneiro i sur. (2017) proveli istraživanje o utjecaju ta dva herbicida na razvoj embrija žabe *Pelophylax perezi*. Embriji su izloženi rasponu koncentracija od 5-25 mg/L linurona i 10-50 mg/L S-metolaklora tijekom 192 sata. Postotak preživjelih embrija u kontroli bio je 100 %, za tretman s linuronom 40 % i 0 % za tretman s S-metolaklorom pri 50 mg/L. No, pri manjim koncentracijama ovih herbicida većina embrija se izlegla do kraja pokusa. Također je uočeno smanjenje rasta i pojava određenih deformacija na tijelu kod izlegnutih punoglavaca pri gotovo svim koncentracijama linurona i S-metolaklora. Ovi rezultati pokazuju da izloženost embrija *P. perezi* ovim dvama herbicidima pri navedenim koncentracijama ima utjecaja na njihov razvoj, postotak

preživljavanja, rast i pojavu deformacija. Određena je i vrijednost  $LC_{50}$  tijekom 192 sata koliko je trajao pokus koja je za linuron bila 21 mg/L i 37.5 mg/L za S-metolaklor te se iz tih podataka može zaključiti da nisu izrazito toksični za embrije ove vrste zbog toga što su u prirodi prisutne značajno manje koncentracije ovih herbicida nego što su korištene u ovom pokusu.

### **3. ZAKLJUČAK**

Usljed sve većeg širenja poljoprivrednih površina u svijetu, dolazi do povećane upotrebe pesticida te je stoga vrlo važno razumjeti kako te štetne tvari djeluju na vodozemce kako bi se oni mogli zaštititi i kako bi se smanjila njihova ugroženost. Tako je ovim radom, potvrđena teza da su pesticidi jedni od glavnih uzroka ugroženosti i smanjivanja populacija vodozemaca. Dokazano je da pesticidi pri određenim koncentracijama uzrokuju neki oblik morfoloških i fizioloških promjena kod žaba iz porodice Ranidae, kao što su na primjer usporena metamorfoza, hermafroditizam mužjaka nekih vrsta žaba, promjena ponašanja punoglavaca, smanjeni rast i razvoj, tjelesne deformacije itd. No, za potpuno razumijevanje njihovog potencijalnog učinka na smanjivanje populacija vodozemaca potrebna su daljnja istraživanja u budućnosti o toksičnosti pesticida u različitim uvjetima i za širi raspon vrsta. Isto tako, predlaže se izbjegavanje upotrebe pesticida na mjestima gdje postoji mogućnost prisutnosti vodozemaca ili u blizini tih mjesta jer otapanjem snijega ili poplavama dolazi do ispiranja pesticida s poljoprivrednih površina i tako oni dospjevaju u vodene ekosustave gdje se vodozemci razmnožavaju i dolaze u direktni kontakt s pesticidima.

#### 4. LITERATURA

- Bernabó, I., Gallo, L., Sperone, E., Tripepi, E., Brunelli, E. (2011) Survival, Development, and Gonadal Differentiation in *Rana dalmatina* Chronically Exposed to Chlorpyrifos. *Journal of Experimental Zoology* 315: 314-327
- Bernabó, I., Sperone, E., Tripepi, S., Brunelli, E. (2011) Toxicity of Chlorpyrifos to Larval *Rana dalmatina*: Acute and Chronic Effects on Survival, Development, Growth and Gill Apparatus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 704-718
- Comstock, B. A., Sprinkle, S. L., Smith, G. R. (2007) Acute Toxic Effects of Round-Up Herbicide on Wood Frog Tadpoles (*Lithobates sylvaticus*). *Journal of Freshwater Ecology* 22 (4): 705-708
- Cooke, A.S. (1970) The effects of DDT, when used as a mosquito larvicide, on tadpoles of the frog *Rana temporaria*. *Environmental Pollution* 5: 259-273
- Czarniewska, E., Kasprzyk, A., Ziemicki, K. (2003) Effect of paraquat and metoxychlor on antioxidant enzymes in frog *Rana esculenta* L. liver. *Biology Letters* 40 (2): 125-133
- Hayes, T. B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. (2010) The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology* 213 (6): 921-933
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2003) Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence. *Environmental Health Perspectives* 111: 568-575

- Johansson, M., Piha, H., Kylin, H., Merila, J. (2006) Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 3164-3170
- Lavorato, M., Bernabo, I., Crescente A., Denoël, M., Tripepi, S., Brunelli, E. (2012) Endosulfan Effects on *Rana dalmatina* Tadpoles: Quantitative Developmental and Behavioural Analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63: 253-262
- Leiva-Presa, A., Jenssen, B.M. (2006) Effects of p,p-DDE on Retinoid Homeostasis and Sex Hormones of Adult Male European Common Frogs (*Rana temporaria*). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 69 (22): 2051-2062
- Mallet, J. (1989) The evolution of insecticide resistance: have the insects won? *Trends in Ecology and Evolution* 4: 336-340
- Mikó, Z., Ujszegi, J., Gal, Z., Hettyey, A. (2017) Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 140: 96-102
- Perkis, P.J., Boermans H.J., Stephenson G.R. (2000) Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 940-945
- Quassinti, L., Maccari, E., Murri, O., Bramucci, M. (2008) Effects of paraquat and glyphosate on steroidogenesis in gonads of the frog *Rana esculenta* in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 91-95
- Quintaneiro, C., Soares, A., Monteiro, M.S. (2017) Effects of the herbicides linuron and S- metolachlor on Perez's frog embryos. *Chemosphere* 194: 595-601

- Rohr, J.R. (2018) Atrazine and Amphibians: A Story of Profits, Controversy, and Animus. *Encyclopedia of the Anthropocene* 141-148
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786