

UTVRĐIVANJE I KVANTIFIKACIJA STANDARDNIH I NOVIH BIHEVIORISTIČKIH ELEMENATA I NJIHOVA PRIMJENA KAO BIOMARKERA IZLOŽENOSTI GUJAVICA (LUMBRICIDAE) I VODENBUHA (DAPHNIIIDAE) MODELNIM ZAGAĐIVALIMA

Đerđ, Tamara

Doctoral thesis / Doktorski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:488439>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Tamara Đerđ

**UTVRĐIVANJE I KVANTIFIKACIJA
STANDARDNIH I NOVIH BIHEVIORISTIČKIH
ELEMENATA I NJIHOVA PRIMJENA KAO
BIOMARKERA IZLOŽENOSTI GUJAVICA
(LUMBRICIDAE) I VODENBUHA
(DAPHNIIDAE) MODELNIM ZAGAĐIVALIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Tamara Đerđ

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF
STANDARD AND NOVEL BEHAVIORAL
ELEMENTS AND THEIR APPLICATION AS
BIOMARKERS OF EXPOSURE OF
EARTHWORMS (LUMBRICIDAE) AND WATER
FLEAS (DAPHNIIDAE) TO MODEL
POLLUTANTS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za kvantitativnu ekologiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Branimira K. Hackenbergera i komentora dr. sc. Tina Klanjšćeka, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORU: prof. dr. sc. Branimir Hackenberger Kutuzović, profesor u trajnom zvanju

Prof. dr. sc. Branimir Hackenberger Kutuzović, rođen 1965. godine, istaknuti je hrvatski znanstvenik i redoviti profesor u trajnom zvanju na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomirao je biologiju i kemiju na Pedagoškom fakultetu istog sveučilišta, a magisterij i doktorat znanosti stekao je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorsku disertaciju pod naslovom "Optimizacija modela praćenja onečišćenja voda pomoću molekularnih biljega u riba" obranio je 2001. godine.

Od 1996. godine kontinuirano je zaposlen na Odjelu za biologiju u Osijeku, gdje je nositelj brojnih kolegija na prijediplomskom i diplomskim studijima, uključujući Kvantitativnu biologiju, Biokemijske mehanizme toksičnosti, Molekularnu ekotoksikologiju, Kvantitativnu ekologiju, Ekotoksikologiju te Ekološko modeliranje i predviđanje. Tijekom svoje karijere mentorirao je brojne završne i diplomske radove te vodio šest doktorskih disertacija.

Prof. Hackenberger Kutuzović sudjelovao je kao voditelj ili suradnik na više od 30 domaćih i međunarodnih znanstvenih projekata. Trenutno vodi jedan projekt financiran od Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) te dva projekta financirana iz EU sredstava. Njegova znanstvena produktivnost obuhvaća 76 izvornih znanstvenih radova i preko 100 priopćenja na međunarodnim i domaćim znanstvenim i stručnim skupovima.

U veljači 2024. godine, zajedno sa suprugom prof. dr. sc. Davorkom K. Hackenberger, sudjelovao je u znanstvenoj ekspediciji na Novoj Kaledoniji, gdje su istraživali ekotoksikologiju tla i utjecaj rudnika nikla na lokalnu floru i faunu. Njihov rad na ovom području predstavlja značajan doprinos razumijevanju utjecaja industrijskih aktivnosti na osjetljive ekosustave.

Prof. Hackenberger Kutuzović također je autor knjige "Data Analysis in Medical Research – From Foe to Friend", koja je prezentirana na svečanom obilježavanju 30 godina izdavanja časopisa Croatian Medical Journal. Knjiga objedinjuje kolumne objavljivane u tom časopisu tijekom dvije godine, pružajući vrijedan resurs za istraživače u medicinskim znanostima.

Njegov znanstveni interes obuhvaća ekotoksikologiju, kvantitativnu ekologiju i ekološko modeliranje, s posebnim naglaskom na primjenu matematičkih i statističkih metoda u analizi ekoloških podataka. Kao voditelj Laboratorija za kvantitativnu ekologiju na Odjelu za biologiju, predvodi istraživanja usmjerena na razumijevanje složenih ekoloških procesa i njihovih interakcija s okolišnim čimbenicima.

Prof. Hackenberger Kutuzović aktivno sudjeluje u popularizaciji znanosti, održavajući predavanja i radionice na temu klimatskih promjena, održive zaštite okoliša i modeliranja budućnosti. Njegov doprinos znanstvenoj zajednici i društvu u cjelini čini ga istaknutim stručnjakom u području biologije i kvantitativne ekologije u Hrvatskoj.

INFORMACIJE O KOMENTORU: dr. sc. Tin Klanjšček, znanstveni savjetnik

Dr. sc. Tin Klanjšček istaknuti je znanstvenik i voditelj Laboratorija za informatiku i modeliranje okoliša pri Zavodu za istraživanje mora i okoliša na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Akademsku karijeru započeo je diplomom inženjera fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, nakon čega je doktorirao biološku oceanografiju na prestižnom zajedničkom programu Massachusetts Institute of Technology (MIT) i Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI) u Sjedinjenim Američkim Državama.

Dr. sc. Klanjšček specijalizirao se za područja ekološkog modeliranja i okolišne informatike. Njegove aktivnosti usmjerene su na procjenu prirodnih ekosustava, procjenu rizika te održivo upravljanje prirodnim resursima. Kao voditelj Laboratorija za informatiku i modeliranje okoliša, vodi tim posvećen razvoju matematičkih modela, naprednim metodama obrade, vizualizacije i diseminacije okolišnih podataka, te predviđanju utjecaja na vodene i kopnene ekosustave.

Njegov znanstveni rad pokriva širok spektar tema, uključujući ekološko modeliranje, matematičku biologiju, akvakulturu, morske sisavce i ekotoksikologiju. Do sada je objavio 46 znanstvenih radova, brojna kongresna priopćenja i poglavlja u knjigama, čime je dao značajan doprinos znanstvenoj zajednici.

Dr. sc. Klanjšček aktivno sudjeluje u znanstvenim projektima usmjerenim predviđanje učinaka klimatskih promjena na ekosustave i razvoj strategija prilagodbe. Među značajnijim projektima ističu se: “Prilagodba uzgoja bijele ribe klimatskim promjenama” (AqADAPT, HRZZ IP-2018-01-3150), gdje je bio voditelj, “Prilagodba mjera kontrole populacije komaraca klimatskim promjenama u Hrvatskoj” (CADAPT, KK.05.1.1.02.0008), u kojem je sudjelovao kao istraživač, te aktualni projekt “Napredni modeli dinamičkih energijskih budžeta s transportnom mrežom” (AdvanDEB, HRZZ IP-2024-05-3615), financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost

Kroz svoj rad, dr. sc. Tin Klanjšček značajno doprinosi razumijevanju ekoloških procesa i održivom upravljanju prirodnim resursima. Njegov doprinos hrvatskoj znanstvenoj zajednici prepoznat je ne samo kroz znanstvena postignuća već i kroz njegovo vodstvo i suradnju u ključnim istraživačkim inicijativama.

Zahvale

Izražavam iskrenu i duboku zahvalnost svom mentoru, prof. dr. sc. Branimiru Hackenbergeru Kutuzoviću, na njegovoj izuzetnoj stručnosti, nesebičnoj podršci i nadahnjujućem vodstvu kroz svaki korak mog istraživanja. Bio je ne samo vodič kroz izazove ove disertacije već i uzor koji ću slijediti u budućem profesionalnom životu. Njegova predanost znanosti, spremnost na dijeljenje znanja i iskustva te neiscrpna strpljivost i razumijevanje ostavili su neizbrisiv trag u mom radu i razvoju. Hvala Vam što ste vjerovali u mene čak i u trenucima kada je moja vlastita vjera bila poljuljana.

Također, iskreno zahvaljujem svom komentoru, dr. sc. Tinu Klanjščeku, na sjajnim idejama, konstruktivnoj kritici i neprocjenjivoj podršci. Njegova stručnost, motivirajuće riječi i ljudski pristup bili su od iznimne važnosti tijekom cijelog mog istraživanja, a njihov utjecaj zasigurno će oblikovati i buduće korake u mom znanstvenom radu.

Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za kvantitativnu ekologiju na podršci i pomoći tijekom izrade disertacije. Posebno hvala prof. dr. sc. Davorki Hackenberger Kutuzović na brojnim savjetima i pomoći tijekom rada.

Hvala i Domagoju Hackenbergeru Kutuzoviću na podijeljenom znanju, korisnim savjetima, konstruktivnim raspravama i uvijek spremnosti na pomoć.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji, koja mi je kroz cijeli ovaj proces bila oslonac i neiscrpan izvor snage. Posebno zahvaljujem svojoj majci, čija su ljubav, strpljenje i neizmijerna podrška bili temelj moje motivacije, te svojoj baki, čija je mudrost, vjera u mene i tople riječi ohrabrenja osvjetljavale moj put i u najizazovnijim trenucima. Vaša bezuvjetna podrška i ljubav podsjećali su me na važnost ustrajnosti i dovršetka onoga što sam započela, ne samo zbog vlastitog cilja već i zbog vas koji ste uvijek vjerovali u mene.

Na kraju, zahvaljujem svima koji ste bili uz mene na ovom putu. Vaš doprinos zauvijek će biti utkan u svaku stranicu ove disertacije. Ova postignuća ne bi bila moguća bez svih vas, stoga vam od srca veliko hvala.

UTVRĐIVANJE I KVANTIFIKACIJA STANDARDNIH I NOVIH BIHEVIORISTIČKIH
ELEMENTATA I NJIHOVA PRIMJENA KAO BIOMARKERA IZLOŽENOSTI GUJAVICA
(LUMBRICIDAE) I VODENBUHA (DAPHNIIDAE) MODELNIM ZAGAĐIVALIMA

TAMARA ĐERĐ

Promjene u ponašanju organizama sve su više prepoznate kao rani i osjetljivi biomarkeri izloženosti zagađivalima. U ovom istraživanju primijenjeni su standardni i predstavljeni su novi bihevioristički elementi modelnih organizama, predstavnika gujavica i vodenbuha. Primjenom tehnika strojnog učenja razvijeni su alati za precizno praćenje promjena u ponašanju organizama pri izloženosti različitim koncentracijama pesticida. Rezultati pokazuju smanjenje aktivnosti pri višim koncentracijama, dok su niže koncentracije u pojedinim slučajevima uzrokovale blagu stimulaciju aktivnosti. Ovakvi bihevioristički odgovori pružaju rane i pouzdane pokazatelje subletalnih učinaka pesticida te nadopunjuju tradicionalne biokemijske pokazatelje. Ovakav pristup kvantifikaciji biheviorističkih elemenata predstavlja inovativan korak u ekotoksikološkim istraživanjima i procjeni ekoloških rizika, s potencijalnom primjenom u sustavima monitoringa i regulaciji uporabe pesticida.

Rad je izrađen u Zavodu za kvantitativnu ekologiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

(246 stranica, 147 slika, 20 tablica, 231 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: ponašanje, bihevioristička ekotoksikologija, duboko učenje, trajektorij, doza-odgovor

Mentor: prof. dr. sc. Branimir Hackenberger Kutuzović, trajno zvanje

Komentor: dr. sc. Tin Klanjšček, znanstveni savjetnik

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Petar Kružić

prof. dr. sc. Ivana Maguire, trajno zvanje

dr. sc. Marta Popović, viši znanstveni suradnik

dr. sc. Ines Sviličić Petrić, znanstveni savjetnik

DETECTION AND QUANTIFICATION OF STANDARD AND NOVEL BEHAVIORAL
ELEMENTS AND THEIR APPLICATION AS BIOMARKERS OF EXPOSURE OF
EARTHWORMS (LUMBRICIDAE) AND WATER FLEAS (DAPHNIIDAE) TO MODEL
POLLUTANTS

TAMARA ĐERĐ

Behavioral changes are increasingly recognized as early and sensitive biomarkers of exposure to pollutants. This study applied standard and introduced novel behavioral elements in model organisms, specifically earthworms and water fleas. Using machine learning techniques, tools were developed for precise monitoring of behavioral changes in organisms exposed to various concentrations of pesticides. The results indicate reduced activity at higher concentrations, while lower concentrations in some cases caused slight stimulation of activity. These behavioral responses provide early and reliable indicators of the sublethal effects of pesticides, complementing traditional biochemical biomarkers. This approach to quantifying behavioral elements represents an innovative step in ecotoxicological research and ecological risk assessment, with potential applications in monitoring systems and the regulation of pesticide use.

The research was conducted at the Subdepartment of Quantitative Ecology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

(246 pages, 147 figures, 20 tables, 231 references, original in Croatian)

Keywords: behavior, behavioral ecotoxicology, deep learning, trajectory, dose-response

Supervisor: Branimir Hackenberger Kutuzović, PhD, full professor tenure

Co-supervisor: Tin Klanjšček, PhD, scientific adviser

Reviewers: Petar Kružić, PhD, full professor

Ivana Maguire, PhD, full professor tenure

Marta Popović, PhD, senior scientific associate

Ines Sviličić Petrić, PhD, scientific adviser

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Problem istraživanja	1
1.2. Ciljevi istraživanja	5
1.2.1. Osnovni cilj istraživanja	6
1.2.2. Specifični ciljevi istraživanja	6
1. Identifikacija i kvantifikacija standardnih biheviorističkih elemenata	6
2. Istraživanje novih biheviorističkih elemenata	6
3. Procjena osjetljivosti biheviorističkih elemenata na koncentraciju i trajanje izloženosti zagađivalima	7
4. Istraživanje sinergijskih i antagonističkih učinaka binarnih mješavina pesticida	7
5. Razvoj računalnog softvera za automatiziranu kvantifikaciju biheviorističkih elemenata	7
7. Poboljšanje metodologija za ekotoksikološka istraživanja putem integracije biheviorističkih biomarkera	7
1.3. Hipoteze	8
H1. Promjena koncentracije zagađivala mjerljivo mijenja kvantitativna obilježja biheviorističkih elemenata kod gujavica (Lumbricidae) i vodenbuha (Daphniidae).	8
H2. Dužina trajanja izlaganja je značajna varijabla kvantitativne karakterizacije biheviorističkih elemenata.	8
H3. Bihevioristički elementi se međusobno razlikuju u osjetljivosti na prisutnost i koncentraciju zagađivala te na dužinu trajanja izlaganja.	8
H4. Postoje bihevioristički elementi koji do sada nisu mjereni, a značajno poboljšavaju interpretabilnost rezultata biheviorističkih ekotoksikoloških testova.	8
1.4. Značaj istraživanja	9
2. LITERATURNI PREGLED	12
2.1. Bihevioristički elementi kao biomarkeri	12
2.2. Gujavice (Lumbricidae) i vodenbuhe (Daphniidae) u ekotoksikološkim istraživanjima	14
2.2.1. Gujavice (Lumbricidae) u ekotoksikološkim istraživanjima	15
2.2.1.1. Gujavice i procjena učinaka pesticida	16
2.2.1.2. Izbjegavanje kontaminiranih područja kao bihevioristički biomarker	19
2.2.2. Vodenbuhe (Daphniidae) u ekotoksikološkim istraživanjima	21
2.2.2.1. Vodenbuhe i procjena učinaka pesticida	24
2.2.2.2. Bihevioristički biomarkeri vodenbuha	26
2.3. Modelna zagađivala	29
2.3.1. Pesticidi kao modelna zagađivala	31
2.3.1.1. Organofosfatni pesticidi	31
2.3.1.2. Karbamati	34
2.3.1.3. Neonikotinoidni pesticidi	35
2.3.1.4. Triazolni fungicidi	37
2.3.2. Binarne mješavine pesticida	39
2.4. Metode kvantifikacije biheviorističkih elemenata	40
2.4.1. Tradicionalne metode kvantifikacije biheviorističkih elemenata	41
2.4.1.1. Vizualno promatranje i ručno bilježenje podataka	41
2.4.1.2. Standardizirani bihevioristički testovi	42

2.4.2. Suvremeni pristupi kvantifikaciji biheviorističkih elemenata	44
2.4.2.1. Računalni vid i automatizirana analiza	45
2.4.2.2. Strojno učenje i napredne analitičke tehnike	46
2.4.2.3. Softver za analizu biheviorističkih elemenata	48
3. MATERIJALI I METODE	49
3.1. Eksperimentalni organizmi	49
3.1.1. Vodenbuha vrste <i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	49
3.1.2. Gujavica vrste <i>Dendrobaena veneta veneta</i> Rosa, 1886	50
3.2. Modelni toksikanti	50
3.3. Eksperimentalni uvjeti i dizajn eksperimenata	51
3.3.1. Eksperimenti s vodenbuhama	51
3.3.1.1. Izlaganje organizama otopinama pojedinačnih formulacija pesticida	52
3.3.1.2. Izlaganje organizama binarnim mješavinama pesticida	52
3.3.2. Eksperimenti s gujavicama	53
3.3.2.1. Izlaganje organizama na filter papiru	53
3.3.2.2. Izlaganje organizama u umjetnom tlu	55
3.4. Metodologija mjerenja biheviorističkih elemenata	56
3.4.1. Utvrđivanje i kvantifikacija biheviorističkih elemenata vodenbuha	56
3.4.1.1. Srednja brzina plivanja tijekom promatranog razdoblja (v_{av})	56
3.4.1.2. Maksimalna brzina plivanja organizama (v_{max})	57
3.4.1.3. Indeks pokretljivosti (MI) (udio vremena provedenog u kretanju)	57
3.4.1.4. Prosječna frakcijska brzina (v_{frac}) (prosječna brzina tijekom perioda kretanja)	58
3.4.1.5. Diskontinuitet kretanja (DOM)	58
3.4.1.6. Prosječna duljina frakcija kretanja (MFL_{av})	59
3.4.1.7. Maksimalna duljina frakcija kretanja (MFL_{max})	59
3.4.1.8. Broj promjena smjera (NDC)	59
3.4.1.9. Indeks promjene smjera nakon odmora (AR_DCI)	60
3.4.1.10. Fraktalna dimenzija (FD)	60
3.4.2. Utvrđivanje i kvantifikacija biheviorističkih elemenata gujavica	61
3.4.2.1. Određivanje biheviorističkih elemenata gujavica u okviru modificiranog filter papir testa	61
3.4.2.2. Određivanje biheviorističkih elemenata gujavica u okviru modificiranog testa u tlu	61
3.5. Primjena dubokog učenja u svrhu detekcije izloženosti organizama zagađivalima	65
3.6. Statistička obrada podataka	67
4. REZULTATI	70
4.1. Učinak zagađivala na biheviorističke elemente vodenbuha (<i>D. magna</i> Straus, 1820)	70
4.1.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na biheviorističke elemente vodenbuha	70
4.1.1.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na srednju brzinu plivanja tijekom promatranog razdoblja (v_{av})	70
4.1.1.2. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na maksimalnu brzinu plivanja organizama (v_{max})	77
4.1.1.3. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na indeks pokretljivosti (MI)	84

4.1.1.4. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na prosječnu frakcijsku brzinu (v_{frac})	91
4.1.1.5. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na diskontinuitet kretanja (DOM)	98
4.1.1.6. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av})	105
4.1.1.7. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max})	112
4.1.1.8. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na broj promjena smjera (NDC)	119
4.1.1.9. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na indeks promjene smjera nakon odmora (AR_DCI)	126
4.1.1.10. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na fraktalnu dimenziju (FD)	133
4.1.2. Rezultati analize ovisnosti biheviorističkih elemenata o koncentraciji zagađivala	140
4.1.2.1. Rezultati prilagodbe krivulja ovisnosti o dozi rezultatima nakon 24-satne izloženosti organizama zagađivalima	140
4.1.2.2. Rezultati prilagodbe krivulja ovisnosti o dozi rezultatima nakon 48-satne izloženosti organizama zagađivalima	143
4.1.3. Rezultati eksperimenata s binarnim mješavinama pesticida	145
4.1.4. Detekcija izloženosti organizama zagađivalima primjenom dubokog učenja	148
4.2. Učinak zagađivala na biheviorističke elemente gujavica	151
4.2.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na biheviorističke elemente gujavica u okviru filter papir testa	151
4.2.1.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na srednju brzinu kretanja (v_{av})	151
4.2.1.2. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice	158
4.2.1.3. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na udio vremena proveden u kretanju unatrag	165
4.2.1.4. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na indeks pokretljivosti (MI)	172
4.2.1.4. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na broj podizanja prostomija	179
4.2.2. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na biheviorističke elemente gujavica	186
4.2.2.1. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na ukupnu prijeđenu udaljenost	186
4.2.2.2. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na ukupnu dužinu tunelskog sustava	190
4.2.2.3. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na udaljenost prijeđenu u postojećim hodnicima	194
4.2.2.4. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima	198
5. RASPRAVA	202
6. ZAKLJUČAK	214
POPIS LITERATURE	217
PRILOG 1 - Izoblogrami interakcija binarnih mješavina	242
ŽIVOTOPIS	246

Popis kratica

AChE – acetilkolinesteraza

ANN – umjetna neuronska mreža (eng. *Artificial Neural Network*)

AR_DCI – indeks promjene smjera nakon odmora

BDC – bendiokarb

CA – model koncentracijske adicije (eng. *concentration addition*)

CAT – katalaza

CHP – klorpirifos

DIF – difenkonazol

DOM – diskontinuitet kretanja

FD – fraktalna dimenzija

FEN – fenbukonazol

GLY – glifosat

GST – glutation-S-transferaza

IA – model neovisnog djelovanja (eng. *independent action*)

IMI – imidakloprid

ISO – Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. *International Organization for Standardization*)

MFL_{av} – prosječna duljina frakcija kretanja

MFL_{max} – maksimalna duljina frakcija kretanja

MI – indeks pokretljivosti (udio vremena provedenog u kretanju)

nAChR – nikotinski acetilkolinski receptori

NDC – broj promjena smjera

OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*)

SOD – superoksid-dismutaza

TEB – tebukonazol

v_{av} – srednja brzina kretanja

v_{frac} – prosječna frakcijska brzina

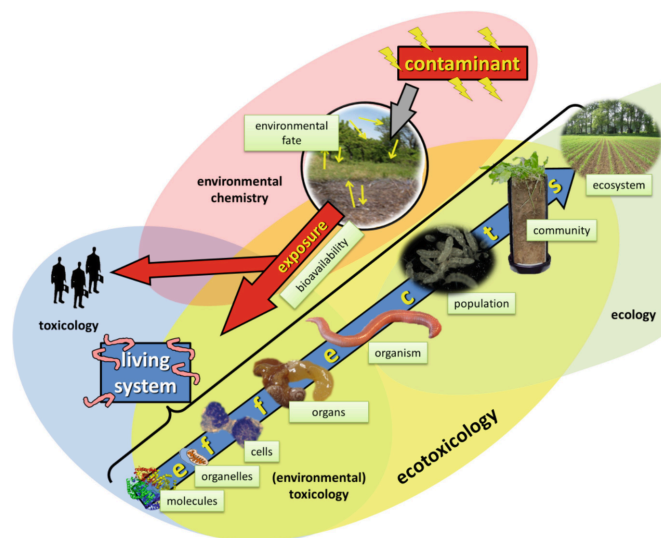
v_{max} – maksimalna brzina kretanja

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)

1. UVOD

1.1. Problem istraživanja

Tvari koje mogu izazvati stres u biološkim sustavima (zagađivala/ksenobiotici) neizostavno su prisutne u svim ekološkim sustavima, a njihova su rasprostranjenost i količina najčešće korelirana s intenzitetom ljudskog djelovanja. Neprestani razvoj novih kemijskih spojeva i materijala te razvoj primarnog i sekundarnog sektora industrije, posebice poljoprivrede, rezultiraju povećanjem izloženosti organizama zagađivalima (Rhind, 2009). Toksični učinci mnogih zagađivala utvrđeni su na različitim razinama biološke i ekološke organizacije i u različitim biljnih i životinjskih vrsta (Truhaut, 1977). Pesticidi, kao najčešće korištena zagađivala u poljoprivredi, predstavljaju značajnu prijetnju ekosustavima zbog svog potencijala da uzrokuju širok spektar bioloških efekata, ne samo na ciljne vrste, već i na neciljne organizme (Zaller i Brühl, 2019). Učinak zagađivala započinje na staničnoj razini, kratkoročnim i lokaliziranim biomolekularnim odgovorom. Izostankom prikladnih zaštitnih staničnih odgovora, djelovanje kemijskih spojeva na staničnoj razini odražava se i na višim razinama biološke i ekološke organizacije, od organizama, preko populacija i zajednica, do čitavih ekoloških sustava; postupno zahvaćajući sve veće vremenske i prostorne skale (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz preklapanja toksikologije, ekotoksikologije, kemije okoliša i ekologije te širenje (eko)toksičnih učinaka kroz biološke sustave (izvor: Bláha i Hofman (2020)).

Sukladno tome, cilj ekotoksikologije je istražiti odgovore na izloženost zagađivalima na razini jedinki i ekstrapolirati nalaze na više razine biološke i ekološke organizacije, primjenom teorijskih i empirijskih pristupa skaliranja (Johnson i Rodgers, 2005; Solomon i sur., 2008).

Ekotoksikološki testovi provode se u strogo kontroliranim uvjetima i sukladno metodologiji propisanoj u standardiziranim protokolima, korištenjem ne-ciljnih modelnih organizama. Tradicionalni biomonitoring i ekotoksikološki testovi često se oslanjaju na fiziološke i biokemijske promjene kao krajnje točke (eng. *endpoints*) odnosno pokazatelje toksičnosti, poput promjena aktivnosti biokemijskih biomarkera stresa (npr. acetilkolinesteraze (AChE), superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i dr.), preživljavanja jedinki, dinamike rasta jedinki, reakcije izbjegavanja, imobilizacije i stope razmnožavanja uslijed izloženosti zagađivalima (Schuijt i sur., 2021; Walker i sur., 2012). Rano otkrivanje toksičnih učinaka je prioritet suvremene organizacije biomonitoringa i upravljanja okolišnim i ekološkim rizicima. Kraće vrijeme detekcije znači i mogućnost pravovremenog djelovanja u smjeru sanacije štete. Zbog toga korištenje mjerljivih promjena ponašanja (bihevioristički biomarkeri) uslijed svog kratkog vremena odziva na okolišni stres, postaju sve značajniji biomarkeri izloženosti (Døving, 1991). Sve veća dostupnost računalne opreme i programskih alata potrebnih za detekciju promjena ponašanja organizama pod utjecajem zagađivala omogućili su razvoj biheviorističke ekotoksikologije.

Ponašanje organizama pruža jedinstvenu priliku za identifikaciju suptilnih promjena koje se događaju kao posljedica izloženosti zagađivalima, i stoga može poslužiti kao rani indikator stresnih uvjeta u okolišu. Dosadašnja istraživanja su pokazala da promjene u ponašanju mogu biti osjetljivije i brže detektirati stres izazvan zagađivalima nego biokemijske promjene (Ågerstrand i sur., 2020; Ford i sur., 2021). Međutim, bihevioristički parametri se u praksi koriste rijetko, dijelom zbog ograničene standardizacije metodologija za kvantifikaciju tih promjena, ali i zbog tehničkih poteškoća u kontinuiranom i preciznom praćenju ponašanja organizama. Uz to, većina istraživanja fokusirana je na nekoliko standardnih biheviorističkih elemenata, kao što su brzina kretanja ili učestalost promjene smjera, dok potencijal novih biheviorističkih elemenata ostaje nedovoljno istražen (Melvin i sur., 2017). U ovom kontekstu, ekotoksikološki testovi koji se temelje na kvantifikaciji ponašanja modelnih organizama, poput gujavica (Lumbricidae) i vodenbuha (Daphniidae), nude izniman potencijal za poboljšanje interpretacije utjecaja pesticida i drugih kemijskih zagađivala na ekosustave (Beaumelle i sur., 2021). Ove vrste organizama često se koriste u ekotoksikološkim istraživanjima zbog svoje ekološke važnosti i osjetljivosti na promjene u

okolišu (Fründ i sur., 2011). Gujavice su ključne za održavanje strukture tla i kruženje hranjivih tvari, dok vodenbuhe igraju važnu ulogu u slatkovodnim ekosustavima, posebno u procesima pročišćavanja vode. Njihovo ponašanje može reflektirati promjene u okolišnim uvjetima uzrokovane izloženošću različitim zagađivalima. Međutim, unatoč važnosti ovih organizama, postojeći ekotoksikološki testovi često nisu prilagođeni za precizno kvantificiranje kompleksnih biheviorističkih odgovora na zagađivala. Standardni testovi uglavnom uključuju praćenje osnovnih oblika ponašanja, dok su složeniji bihevioristički elementi, poput frakcionalne brzine ili promjena u strukturi kretanja organizama, manje istraženi i slabo dokumentirani (Arrázola-Vásquez i sur., 2022; Bownik, 2017; Capowiez i sur., 2003). To rezultira ograničenim razumijevanjem o tome kako različita zagađivala utječu na energetske ravnoteže i resurse organizama u okolišu (Billoir i sur., 2007).

Potreba za detaljnijim razumijevanjem bihevioralnih odgovora na zagađivala proizlazi i iz činjenice da koncentracije pesticida u okolišu variraju, često u niskim, subletalnim razinama, koje mogu imati kronične učinke na ponašanje i preživljavanje organizama (Walker i sur., 2012). Također, u okolišu su zagađivala često prisutna u mješavinama, što može izazvati sinergijske ili antagonističke efekte na organizme, a takvi efekti su trenutno nedovoljno istraženi u kontekstu istraživanja usmjerenih na ponašanje organizama (Fleeger i sur., 2003).

Istraživanja u ovoj grani ekotoksikologije u najvećoj mjeri su zastupljena u akvatičkim sustavima, korištenjem standardnih akvatičkih modelnih organizama, vodenbuha (*Daphnia magna* Straus, 1820) i zebrica (*Danio rerio* F. Hamilton, 1822). Bihevioristički elementi prepoznati su kao osjetljivi biomarkeri izloženosti subletalnim koncentracijama zagađivala u akvatičkih modelnih organizama (Bownik, 2017; Hussain i sur., 2020) te privlače sve veću pozornost znanstvenika ne samo kao segment istraživanja, već i u svrhu njihove primjene kao krajnjih točaka u regulaciji kemijskih spojeva (Ågerstrand i sur., 2020). Najčešće krajnje točke biheviorističkih istraživanja u akvatičkim sustavima su prosječna brzina plivanja, maksimalna brzina plivanja, udio vremena koje je jedinka provela krećući se, broj promjena smjera, stupanj složenosti putanja jedinki, intenzitet pokretljivosti i dr. (Bownik, 2017). Dosadašnjim istraživanjima dokazan je utjecaj brojnih kemijskih tvari i abiotičkih čimbenika na najčešće proučavane biheviorističke elemente vodenbuha. Znanstvene publikacije opisuju utjecaj pojedinih pesticida (npr. Duquesne i Küster, 2010), nanočestica (npr. Lovern i sur., 2007), antibiotika (npr. Bownik i sur., 2019), i drugih kemijskih spojeva (npr. Untersteiner i sur., 2003) te temperature, pH, prozirnosti vode, fotoperioda i drugih čimbenika (npr. Chen i sur., 2012) na značajke ponašanja akvatičkih modelnih organizama. Pri tome, većina

istraživanja u kojima su kao modelni organizmi korištene vodenbuhe primjenjuje gotova hardverska i softverska rješenja za analizu biheviorističkih elemenata modelnih organizama (npr. Bownik i Pawlik-Skowrońska, 2019; Duquesne i Küster, 2010). Iako korištenje gotovih uređaja i softverskih alata omogućuje kalibraciju višestrukim međusobnim usporedbama (eng. *cross-calibration*) i međusobnu provjeru (validaciju) rezultata neovisnih timova, ono u isto vrijeme smanjuje fleksibilnost u obradi podataka u smislu uvođenja novih indeksa ponašanja i kvantifikacije biheviorističkih elemenata organizama, a time onemogućuje precizniju interpretaciju rezultata istraživanja i nova istraživanja.

Zbog važne uloge u procesima koji se odvijaju u tlu i osjetljivosti na prisutnost zagađivala, gujavice se smatraju indikatorima stanja u okolišu te se koriste kao modelni organizmi u standardnim ekotoksikološkim testovima Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) i Međunarodne organizacije za standardizaciju (eng. *International Organization for Standardization*, ISO). Među biomarkerima utjecaja subletalnih koncentracija zagađivala od posebne su važnosti pokazatelji ponašanja organizama, budući da promjene u ponašanju mogu upućivati na štetnost zagađivala na kondicijsko stanje jedinki, a koje se može odražavati i na višim stupnjevima biološke i ekološke organizacije (Døving, 1991; Little, 1990). Ponašanje izbjegavanja jedan je od češće praćenih krajnjih točaka istraživanja učinaka subletalnih koncentracija zagađivala na gujavice. Test izbjegavanja predstavljen je u radu Yeardley i sur., (1996), a danas, kada se provodi prema ISO protokolu (ISO, 2008), je gotovo neizostavni dio preliminarnih ekotoksikoloških istraživanja. Prema standardnom protokolu, test izbjegavanja izvodi se u zatvorenim posudama s dva ili šest odjeljaka, pri čemu se organizmi na početku ispitivanja puštaju u središnji prostor, a tijekom trajanja testa je osigurano njihovo neometano kretanje i “istraživanje” odjeljaka testnih tala. Po završetku perioda inkubacije, između odjeljaka se umeću pregrade i slijedi prebrojavanje organizama prisutnih u svakom odjeljku. Postotak izbjegavanja testne tvari ili uzorka nepoznatog sastava porijeklom iz okoliša izračunava se na temelju broja gujavica u kontrolnom i testnom odjeljku.

Istraživanja usmjerena na kvantifikaciju elemenata ponašanja direktnim opažanjem u kopnenih organizama su malobrojna i slabo zastupljena zbog poteškoća koje proizlaze iz karakteristika tla kao medija. Metodologija korištena u većini istraživanja usmjerenih na proučavanje značajki ponašanja gujavica tijekom vremena, direktno u tlu, razvijena je sredinom prošlog stoljeća (Evans, 1947). Ona podrazumijeva korištenje tzv. 2D terarija kao eksperimentalne komore ispunjene testnim tlom čiji dizajn, u smislu njegovih dimenzija i

širine prostora ispunjenog testnim tлом, je potrebno prilagoditi anatomskim i ekološkim značajkama odabrane testne vrste. Položaj gujavice u 2D terariju registrira se nekoliko (najčešće pet) puta dnevno, ručnim ocrtavanjem i rekonstrukcijom sustava hodnika na prozirnoj foliji prema subjektivnoj procjeni osobe zadužene za ovaj zadatak (istraživača ili laboratorijskog tehničara). Po završetku izlaganja, sustav hodnika naslikan na transparentnoj foliji digitalizira se pomoću skenera te služi kao ulazni podatak za izračun osnovnih značajki ponašanja gujavica - ukupne dužine tunelskog sustava, stope ponovnog iskorištavanja hodnika i ukupne prijeđene udaljenosti (Capowiez i Bérard, 2006). Budući da su bihevioristički elementi gujavica dokazani kao vrlo osjetljivi biomarkeri izloženosti organizama subletalnim koncentracijama zagađivala, nekoliko timova znanstvenika je tijekom posljednjih godina razvilo inovativna alternativna rješenja za kontinuirano praćenje ponašanja gujavica direktno u tlu temeljenih na suvremenim računalnim metodama. Takva rješenja uključuju detekciju reakcije izbjegavanja kontinuiranim mjerenjem električne impedance tla (Rastetter i Gerhardt, 2018), kontinuirano vizualno dokumentiranje položaja gujavica na temelju niza fotografija semi-automatskom metodom (Arrázola-Vásquez i sur., 2022) i automatsku rekonstrukciju tunelskog sustava te izračun parametara kretanja i topoloških značajki tunelskog sustava primjenom umjetne neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Network*, ANN) (Djerdj i sur., 2020).

1.2. Ciljevi istraživanja

Znanstveni kontekst ovog istraživanja leži u potrebama za razvijanjem preciznijih, kvantitativnih metoda za praćenje i analizu ponašanja organizama, koji mogu pružiti bolji uvid u utjecaj zagađivala na ekosustave. Razvoj novih metoda temeljenih na računalnim tehnikama, poput strojnog učenja, omogućava automatizirano i točno bilježenje kompleksnih biheviorističkih elemenata, čime se otvara mogućnost za standardizaciju i širu primjenu ovih pristupa u ekotoksikološkim testovima (He i sur., 2019).

Ključni izazov u ovom istraživanju je identificirati i kvantificirati nove biheviorističke elemente koji do sada nisu mjereni, ali koji imaju potencijal značajno poboljšati interpretabilnost ekotoksikoloških testova. Ti elementi mogu uključivati parametre kao što su impulzivnost, prosječna i maksimalna dužina segmenata trajektorija, te druge pokazatelje koji reflektiraju suptilne promjene u energetsom stanju organizama (Posthuma i sur., 2019). Osim toga, istraživanje će nastojati procijeniti razlike u osjetljivosti različitih biheviorističkih

elemenata na promjene u koncentraciji zagađivala i dužinu izlaganja, što je ključno za razumijevanje kako različite vrste organizama odgovaraju na stresne uvjete u okolišu (Hellou, 2011).

Ovo istraživanje ima za cilj ne samo unaprijediti postojeće ekotoksikološke metode, već i doprinijeti razvoju novih biomarkera koji mogu biti korišteni u procjeni rizika od izlaganja zagađivalima (Hellou, 2011). Očekuje se da će rezultati istraživanja pružiti dublje razumijevanje o učincima zagađivala na ponašanje organizama, kao i nove alate za praćenje ekološkog stanja okoliša (Ford i sur., 2021). Time će se otvoriti mogućnost za primjenu biheviorističkih elemenata u širokom spektru ekotoksikoloških studija, uključujući istraživanja utjecaja klimatskih promjena i novih zagađivala na biološku raznolikost i ekosustave (Lemm i sur., 2021; Melvin i sur., 2017; X. Wang i sur., 2019).

1.2.1. Osnovni cilj istraživanja

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je detektirati i kvantificirati standardne i nove biheviorističke elemente odabranih modelnih organizama, gujavica (Lumbricidae) i vodenbuha (Daphniidae) te utvrditi njihovu primjenjivost kao biomarkera izloženosti modelnim zagađivalima.

1.2.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. Identifikacija i kvantifikacija standardnih biheviorističkih elemenata

Jedan od prvih specifičnih ciljeva ovog istraživanja bio je analizirati standardne biheviorističke elemente kod gujavica (srednja brzina, indeks pokretljivosti, ukupna prijeđena udaljenost, ukupna dužina tunelskog sustava) i vodenbuha (srednja i maksimalna brzina, indeks pokretljivosti, broj promjena smjera, fraktalna dimenzija), te utvrditi u kojoj mjeri navedeni elementi reflektiraju utjecaj zagađivala u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

2. Istraživanje novih biheviorističkih elemenata

Drugi ključni specifični cilj bio je identificirati i kvantificirati nove biheviorističke elemente koji do sada nisu bili mjereni ili analizirani u kontekstu ekotoksikoloških testova. Cilj je bio kvantificirati nove biheviorističke elemente uključujući udio vremena provedenog uz rub Petrijeve zdjelice, udio vremena provedenog u kretanju unatrag, broj podizanja prostomija,

udaljenost i udio puta u postojećim hodnicima kod gujavica te frakcionalnu brzinu, prosječnu i maksimalnu duljinu segmenata trajektorija, učestalost perioda nepokretnosti i indeks promjene smjera nakon odmora kod vodenbuha, te procijeniti njihovu primjenjivost u poboljšanju sposobnosti predviđanja i interpretacije biheviorističkih odgovora organizama na izloženost zagađivalima.

3. Procjena osjetljivosti biheviorističkih elemenata na koncentraciju i trajanje izloženosti zagađivalima

Treći cilj bio je istražiti kako se bihevioristički elementi (standardni i novi) mijenjaju ovisno o koncentraciji zagađivala te o vremenu izlaganja organizama zagađivalima, uz kvantifikaciju osjetljivosti različitih biheviorističkih elemenata na prisutnost pesticida.

4. Istraživanje sinergijskih i antagonističkih učinaka binarnih mješavina pesticida

Četvrti cilj bio je istražiti kako binarne mješavine pesticida utječu na ponašanje organizama te istražiti postojanje interakcija između komponenti mješavina mjerljivih na razini biheviorističkih biomarkera.

5. Razvoj računalnog softvera za automatiziranu kvantifikaciju biheviorističkih elemenata

Peti specifični cilj bio je razvoj i primjena računalnog softvera temeljenog na suvremenim računalnim tehnikama za detekciju i kvantifikaciju biheviorističkih elemenata odabranih modelnih organizama.

7. Poboljšanje metodologija za ekotoksikološka istraživanja putem integracije biheviorističkih biomarkera

Posljednji specifični cilj bio je procijeniti mogućnost unaprjeđenja postojeće ekotoksikološke metodologije kroz integraciju standardnih i novih biheviorističkih elemenata u postojeće testove toksičnosti.

1.3. Hipoteze

H1. Promjena koncentracije zagađivala mjerljivo mijenja kvantitativna obilježja biheviorističkih elemenata kod gujavica (Lumbricidae) i vodenbuha (Daphniidae).

Ova hipoteza pretpostavlja da različite koncentracije pesticida uzrokuju kvantitativno mjerljive promjene u standardnim i novim biheviorističkim elementima, kao što su brzina kretanja, frekvencija promjene smjera, duljina trajektorija i druge karakteristike ponašanja. Očekuje se da bihevioristički odgovori na izloženost pesticidima budu osjetljivi na varijacije u koncentraciji zagađivala.

H2. Dužina trajanja izlaganja je značajna varijabla kvantitativne karakterizacije biheviorističkih elemenata.

Ova hipoteza sugerira da trajanje izlaganja zagađivalima igra ključnu ulogu u promjenama biheviorističkih elemenata organizama. Očekuje se da će duže trajanje izlaganja pesticidima izazvati veće promjene u ponašanju, što će biti kvantitativno izraženo kroz različite biheviorističke parametre.

H3. Bihevioristički elementi se međusobno razlikuju u osjetljivosti na prisutnost i koncentraciju zagađivala te na dužinu trajanja izlaganja.

Ova hipoteza predviđa da bihevioristički elementi, kao što su brzina kretanja, impulzivnost, duljina trajektorija i drugi parametri, imaju različitu osjetljivost na promjene u koncentraciji zagađivala i dužinu izloženosti. Neki elementi će biti osjetljiviji na niske koncentracije pesticida, dok će drugi pokazivati veće promjene tek pri višim koncentracijama ili dužem izlaganju.

H4. Postoje bihevioristički elementi koji do sada nisu mjereni, a značajno poboljšavaju interpretabilnost rezultata biheviorističkih ekotoksikoloških testova.

Ova hipoteza polazi od pretpostavke da postoje do sada neistraženi bihevioristički elementi, poput impulzivnosti i segmentne duljine trajektorija, koji mogu značajno unaprijediti interpretaciju rezultata ekotoksikoloških testova. Ovi novi elementi mogu pružiti dublji uvid u utjecaj zagađivala na organizme, što nije moguće postići samo analizom standardnih biheviorističkih parametara.

1.4. Značaj istraživanja

Istraživanje predstavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji ima znanstvenu i praktičnu važnost u području ekotoksikologije, biomonitoringa i zaštite okoliša. Uvođenjem novih biheviorističkih biomarkera, koji omogućuju kvantitativnu procjenu utjecaja zagađivala na kopnene i vodene organizme, istraživanje popunjava važnu prazninu u dosadašnjem znanju. Bihevioristički biomarkeri nude osjetljiv i brz odgovor na prisutnost toksičnih tvari, pružajući uvid u subletalne učinke zagađivala koji se često ne mogu detektirati konvencionalnim biokemijskim ili fiziološkim metodama. Navedeno ima važne implikacije na ekotoksikološka istraživanja, ali i na širu primjenu u industriji, zaštiti okoliša i javnom zdravstvu.

1. Unapređenje ekotoksikoloških metoda

Jedan od ključnih doprinosa ovog istraživanja je razvoj novih i unapređenje postojećih metoda za kvantifikaciju ponašanja organizama pod utjecajem zagađivala. Tradicionalne ekotoksikološke metode obično se fokusiraju na biokemijske i fiziološke pokazatelje, kao što su enzimске aktivnosti, oksidativni stres ili smrtnost organizama. Međutim, ove metode često ne detektiraju subletalne učinke koji se javljaju kod izloženosti niskim koncentracijama zagađivala. Ponašanje organizama, s druge strane, može biti osjetljiviji pokazatelj izloženosti, jer reflektira trenutne promjene u organizmu koje se događaju zbog toksičnog stresa. Razvoj novih biheviorističkih biomarkera, kao što su frakcionalna brzina, parametri povezani s fragmentima trajektorija, usio vremena provedenog uz rub eksperimentalne komore te u kretanju unatrag i broj podizanja prostomija, donosi inovativni pristup u kvantificiranju utjecaja zagađivala. Ovi bihevioristički parametri omogućuju bolje razumijevanje suptilnih promjena u fiziološkom i psihološkom stanju organizma koje bi tradicionalne metode mogle zanemariti. To dovodi do preciznijeg i sveobuhvatnijeg ocjenjivanja toksičnosti zagađivala i omogućuje razvoj boljih standarda za procjenu rizika.

2. Poboljšanje biomonitoringa okoliša

Primjena biheviorističkih biomarkera može značajno unaprijediti biomonitoring okoliša. Tradicionalni biomonitoring često se oslanja na fiziološke biomarkere koji zahtijevaju uzorkovanje tkiva organizama i složenu laboratorijsku analizu, što može biti vremenski i financijski zahtjevno. Korištenje biheviorističkih elemenata omogućuje kontinuirano i neinvazivno praćenje organizama u stvarnom vremenu, što je posebno korisno u procjeni kvalitete okoliša. Kroz ovaj rad razvijeni su novi pristupi praćenju i kvantifikaciji

biheviorističkih odgovora organizama u odnosu na koncentracije pesticida i zagađivala u okolišu. Integracija biheviorističkih biomarkera u sustave za praćenje omogućuje brže reakcije na promjene u okolišnim uvjetima, čime se može poboljšati upravljanje rizicima zagađenja. Ova istraživanja također pružaju mogućnost razvoja automatiziranih sustava praćenja koji koriste računalne tehnologije za analizu ponašanja organizama, što može biti korisno za javne institucije i industrije odgovorne za očuvanje okoliša.

3. Bolje razumijevanje učinaka subletalnih koncentracija zagađivala

Većina ekotoksikoloških istraživanja fokusira se na letalne učinke zagađivala, no u prirodnim uvjetima organizmi su često izloženi subletalnim koncentracijama toksikanata kroz dulje vremensko razdoblje. Takva izloženost može dovesti do promjena u ponašanju, što može utjecati na preživljavanje, reprodukciju i interakcije među vrstama. Doprinos ovog istraživanja su nova saznanja glede osjetljivosti biheviorističkih biomarkera na subletalne koncentracije zagađivala i kao alata rane indikacije stresa u organizmima, čak i kada fiziološki pokazatelji još ne pokazuju promjene. Ova saznanja o subletalnim učincima mogu imati dalekosežne posljedice za procjenu rizika zagađivanja okoliša. Primjena novih biheviorističkih parametara omogućuje bolje razumijevanje dugoročne učinke izloženosti niskim koncentracijama zagađivala, što je važno za procjenu ekoloških rizika i uspostavljanje regulatornih granica.

4. Razvoj novih tehnologija za kvantifikaciju biheviorističkih elemenata

Značajan doprinos ovog istraživanja je razvoj softvera i primjena tehnika strojnog učenja za kvantifikaciju biheviorističkih elemenata organizama. Korištenje računalne tehnologije omogućuje automatsku analizu ponašanja, smanjuje mogućnost ljudske pogreške te osigurava objektivnost u praćenju promjena u ponašanju organizama. Softver razvijen u sklopu istraživanja u okviru ove disertacije koristi industrijske kamere za snimanje ponašanja organizama te analizira podatke pomoću algoritama strojnog učenja za detekciju i kvantifikaciju biheviorističkih elemenata. Primjena ovih tehnologija omogućuje automatiziranu analizu velikih količina podataka, čime se smanjuje potreba za dugotrajnim ručnim analizama i tako se povećava učinkovitost istraživanja. Ove inovacije primjenjive su u širokom spektru znanstvenih i industrijskih istraživanja, uključujući testiranje pesticida, procjenu zagađenja u prirodnim ekosustavima i praćenje učinaka klimatskih promjena na ponašanje organizama.

5. Povećanje preciznosti u procjeni ekoloških rizika

Korištenje biheviorističkih elemenata kao biomarkera omogućuje preciznije i sveobuhvatnije ocjenjivanje ekoloških rizika povezanih s izlaganjem zagađivalima. Tradicionalni pristupi procjene rizika često se oslanjaju na letalne učinke, dok subletalni učinci ostaju neistraženi. Bihevioristički biomarkeri omogućavaju ranu detekciju toksičnih učinaka te pružaju važne informacije o energetske potrebama organizama, što može mjerljivo doprinijeti boljoj procjeni dugoročnih učinaka zagađivanja. Povećanje preciznosti u procjeni ekoloških rizika, doprinosi se zaštiti prirodnih ekosustava, održivom upravljanju resursima i očuvanju bioraznolikosti. Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti kao temelj za buduće standardizirane metode procjene rizika od zagađivala u okolišu.

6. Mogućnost široke primjene u industriji i regulaciji pesticida

Rezultati ovog istraživanja imaju potencijal za široku primjenu u industriji pesticida, poljoprivredi i regulatornim tijelima. Korištenje biheviorističkih biomarkera može pomoći u procjeni sigurnosti pesticida i njihovom utjecaju na ne ciljane organizme u ekosustavima. Industrijski proizvođači pesticida mogli bi koristiti ove metode za testiranje sigurnosti svojih proizvoda prije stavljanja na tržište, dok bi regulatori mogli primijeniti rezultate istraživanja u kreiranju smjernica i normi za korištenje pesticida u poljoprivredi.

Ovo istraživanje ima veliki značaj za unapređenje ekotoksikoloških istraživanja, razvoj novih metoda za procjenu rizika i zaštitu okoliša, kao i za primjenu novih tehnologija u kvantifikaciji biheviorističkih biomarkera. Rezultati ovog rada pridonose boljem razumijevanju utjecaja pesticida na ekosustave, ali i postavljaju temelje za buduće inovacije u procjeni okolišnih rizika.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bihevioristički elementi kao biomarkeri

Bihevioristički elementi predstavljaju osjetljiv alat za procjenu ekoloških učinaka zagađivala. Tradicionalni biomarkeri, kao što su biokemijske i fiziološke promjene poput enzimske aktivnosti i oksidativnog stresa, fokusiraju se na kasnije faze toksičnosti, dok bihevioristički biomarkeri omogućuju ranije otkrivanje subletalnih učinaka (Porrás-Rivera i sur., 2024). Ponašanje organizama odražava integrirani odgovor na okolišne stresore, omogućujući identifikaciju ranih znakova toksičnosti, što čini biheviorističke biomarkere ključnim u procjeni rizika za okoliš (Little, 1990).

Istraživanja koja su uključivala primjenu biheviorističkih elemenata kao biomarkera započele su sredinom 20. stoljeća, kada je prepoznata važnost ponašanja u ekološkim istraživanjima. Kretanje, prehrambeni obrasci i izbjegavanje toksičnih spojeva bili su među prvim biheviorističkim indikatorima korištenim u ekotoksikološkim studijama. Zahvaljujući napretku u tehnologijama praćenja, bihevioristička istraživanja su značajno proširena (Capowiez i sur., 2005; Dell’Omo, 2002; Duquesne i Küster, 2010; Gerhardt, 2007; Yuan i sur., 2021).

Akvatički organizmi poput vodenbuha (*Daphnia* spp.) i riba intenzivno se koriste kao modelni organizmi u biheviorističkim istraživanjima. Na primjer, eksperimenti na vodenbuhama pokazali su da izloženost pesticidima i teškim metalima uzrokuje promjene u obrascima plivanja, uključujući smanjenje brzine plivanja i promjene u trajektorijama kretanja. Promjene u ponašanju mogu biti vrlo specifične za određenu vrstu zagađivala, što omogućava preciznu procjenu toksičnih učinaka. Ribe su također važni modelni organizmi, jer je dokazano kako izloženost teškim metalima, poput žive i kadmija, uzrokuje promjene u obrascima plivanja, ukazujući na neurotoksične i hormonske poremećaje (Liu i sur., 2024; Ren i sur., 2015; Scott i Sloman, 2004). Nadalje, istraživanja su pokazala kako izloženost zebrića pesticidima, poput neonicotinoida i piretroida, može uzrokovati hiperaktivnost, hipokinetičke reakcije te smanjenje sposobnosti promjene smjera plivanja, što upućuje na ozbiljne poremećaje neurološke regulacije kretanja i reakcija na svjetlosne podražaje (Hussain i sur., 2020).

Gujavice (Lumbricidae) su ključni modelni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima tla. Njihovo ponašanje, poput kretanja i kopanja, može pružiti važne informacije o zdravlju tla. Na primjer, studije su pokazale da izloženost gujavica teškim metalima smanjuje njihovu

sposobnost kopanja tunelskih sustava, što se koristi kao indikator ekotoksičnosti tla. Pored toga, smanjenje brzine kretanja pri izlaganju subletalnim koncentracijama pesticida omogućuje ranu detekciju toksičnih učinaka (De Silva i sur., 2010).

Neurotoksičnost zagađivala, kao što su pesticidi i industrijske kemikalije, može se mjeriti kroz biheviorističke biomarkere. Organofosfatni pesticidi, koji inhibiraju enzim AChE, uzrokuju neurološke poremećaje u mnogim vrstama, uključujući vodenbuhe, ribe i gujavice, što dovodi do promjena u obrascima kretanja i motoričkim funkcijama (Z. Ren i sur., 2007, 2009, 2015). Ovi odgovori služe kao rani indikatori prisutnosti zagađivala u okolišu.

Primjena biheviorističkih elemenata u ekotoksikologiji ima nekoliko prednosti. Bihevioristički odgovori organizama mogu biti brzi i osjetljivi, omogućujući rano otkrivanje toksičnih učinaka (Jeong i sur., 2014). Također, ponašanje reflektira integrirani odgovor na stres, uključujući neurološke, fiziološkemetaboličke, stanične i molekularne promjene. Ipak, glavni izazov ostaje standardizacija metoda mjerenja i kvantifikacije biheviorističkih odgovora, kao i prilagodba metoda različitim vrstama organizama i ekosustavima (Dell’Omo, 2002). Napredak u tehnologiji praćenja ponašanja, uključujući računalni vid i strojno učenje, značajno je poboljšao preciznost i reproducibilnost ovih rezultata (Bianco i sur., 2013; Cho i sur., 2022; Heuschele i sur., 2019; Kim i sur., 2023; Kunze i sur., 2016; Liu i sur., 2012; Rodriguez i sur., 2018; Saad Saoud i sur., 2024). Bihevioristički biomarkeri sve više dobivaju na značaju u ekotoksikološkim istraživanjima zbog svoje brzine i osjetljivosti u detekciji subletalnih učinaka zagađivala. Unatoč izazovima, poput standardizacije metoda, napredak u tehnologiji omogućava veću pouzdanost i reproducibilnost rezultata (Ågerstrand i sur., 2020; Häder i Erzinger, 2017; Pérez-Escudero i sur., 2014). Integracija biheviorističkih elemenata s drugim metodama biomonitoringa može poboljšati procjenu ekotoksičnih učinaka i pružiti sveobuhvatniju sliku utjecaja zagađivala na okoliš (Bownik, 2017; Jeong i sur., 2014; Melvin i Wilson, 2013; Peterson i sur., 2017; Scott i Sloman, 2004).

Ponašanje organizama usko je povezano s fitnessom jedinki, a posljedično i s dinamikom populacija, interakcijama među vrstama te funkcijama ekosustava. Bihevioristički odgovori mogu značajno utjecati na reproduktivni uspjeh, preživljavanje, hranjenje i rast, čime utječu na dinamiku populacija i interakcije među vrstama. Na primjer, odabir partnera za parenje ili mjesta za razmnožavanje može izravno utjecati na kvalitetu i broj potomaka, dok reakcije na predatore mogu značiti razliku između života i smrti (Alkimin i sur., 2020; Jennions i Petrie, 1997). Biheviorističke promjene jedinki često imaju posljedice na razini populacije,

uključujući stope nataliteta, mortaliteta i migracije, što dodatno naglašava važnost razumijevanja ponašanja u ekotoksikološkim istraživanjima (Dell’Omo, 2002). Međusobni odnosi između ponašanja jedinki i značajki populacija složene su i dvosmjerne. Jedinke često ispoljavaju ponašanja koja povećavaju vlastiti fitnes, ali mogu biti štetna za populaciju (Cushing i sur., 2015; A. M. Fisher i sur., 2018; Fox, 1975). S druge strane, promjene u dinamici populacija mogu utjecati na ponašanje jedinki, npr. kroz gustoćom uvjetovane učinke poput natjecanja za hranu, traženja partnera ili agresije (Frid i Dill, 2002; Gordon, 1991; Jennions i Petrie, 1997). Ove promjene na razini populacije mogu se odraziti i na šire zajednice i ekosustave, gdje ponašanje jedne vrste može utjecati na jačinu i prirodu interakcija s drugima, čime se oblikuju struktura i stabilnost ekosustava (Falgueras-Cano i sur., 2024; Roy i sur., 2020; Ushio i sur., 2018; Yachi i Loreau, 1999).

Eksperimenti u kontroliranim laboratorijskim uvjetima pružaju važne uvide u biheviorističke odgovore na zagađivala. Dobiveni podaci često se mogu povezati s procesima na razini populacija i ekosustava. Na primjer, istraživanja su pokazala da laboratorijski podaci o ponašanju, poput odvažnosti ili aktivnosti, često predviđaju odgovarajuće promjene u prirodnim uvjetima (D. N. Fisher i sur., 2015). Međutim, povremena neusklađenost između laboratorijskih i terenskih rezultata naglašava potrebu za integracijom laboratorijskih, poluterenskih i terenskih istraživanja kako bi se bolje razumjeli učinci zagađivala na ponašanje (Bownik i Wlodkovic, 2021; Buskey i sur., 1996; Heugens i sur., 2001).

2.2. Gujavice (Lumbricidae) i vodenbuhe (Daphniidae) u ekotoksikološkim istraživanjima

Ekotoksikološka istraživanja često koriste modelne organizme za procjenu učinaka zagađivala na ekosustave, a gujavice (Lumbricidae) i vodenbuhe (Daphniidae) predstavljaju ključne skupine organizama. Zbog svoje osjetljivosti na zagađivala i lakoće manipulacije u laboratorijskim uvjetima, ovi organizmi pružaju važne informacije o toksičnosti kemijskih spojeva u terestričkim i akvatičkim ekosustavima (ISO, 2008, 2023; OECD, 1984, 2004, 2012).

2.2.1. Gujavice (Lumbricidae) u ekotoksikološkim istraživanjima

Gujavice (Oligochaeta, Lumbricidae) su stanovnici tla koji svojom aktivnošću značajno doprinose očuvanju strukture i plodnosti tla u različitim ekosustavima, uključujući šume, travnjake i poljoprivredne površine (Edwards, 2004; Edwards i Arancon, 2022). Njihovo kopanje i kretanje kroz tlo utječe na fizičke karakteristike tla, kemijski sastav i kruženje nutrijenata, što posljedično utječe na sastav zajednica i dinamiku populacija drugih vrsta. Zbog toga se gujavice često nazivaju „inženjerima ekosustava” (Jones i sur., 1994). Njihovo kretanje i ponašanje uvjetovano je trima glavnim čimbenicima: ekološkom kategorijom kojoj pripadaju, abiotičkim čimbenicima i biotičkim interakcijama. S obzirom na ekološku nišu, gujavice se dijele u tri glavne skupine: epigejne, endogejne i anecične vrste (Bouche, 1972, 1977). Epigejne vrste, poput *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*, nalaze se iznad mineralnog sloja tla, ispod biljnih ostataka, te se hrane na površini tla bez kopanja tunela. Anecične i endogejne vrste, poput *Lumbricus terrestris* i *Aporrectodea caliginosa*, prodiru dublje u tlo i stvaraju složene sustave hodnika. Anecične vrste žive u trajnim okomitim tunelima, dok endogejne vrste formiraju horizontalne, privremene tunele u gornjim slojevima tla, gdje se hrane tлом više ili manje obogaćenim organskom tvari (Hackenberger Kutuzović i sur., 2015; Keith i Robinson, 2012). Uz ekološke značajke vrste, abiotički čimbenici kao što su vlažnost tla, dostupnost organske tvari, gustoća tla, temperatura i svjetlost također značajno utječu na prisutnost i aktivnost gujavica u tlu. Vlažnost tla, odnosno količina biološki dostupne vode, primjerice, ključna je za rasprostranjenost većine vrsta gujavica budući kako gujavice dišu čitavom površinom kože, koja mora biti vlažna za učinkovitu izmjenu plinova (Lavelle i Spain, 2001). Kada su uvjeti nepovoljni, poput prevelike ili preniske vlažnosti, gujavice pokazuju prilagodbe kao što su dijapauza ili uvijanje tijela (Holmstrup, 2001; Perreault i Whalen, 2006). Temperatura tla također utječe na aktivnost gujavica. Epigejne vrste izložene su većim temperaturnim promjenama, dok anecične vrste migriraju u dublje slojeve tla, kako bi izbjegle temperaturne ekstreme (Lavelle i Spain, 2001). Količina i kakvoća organske tvari kao izvora hranjivih tvari također potiče kretanje gujavica, osobito kod endogejnih vrsta koje kopanjem traže mjesta povećane koncentracije organske tvari u tlu (Felten i Emmerling, 2009). Gustoća, odnosno rahlost tla također utječe na aktivnost gujavica, pri čemu povećanje gustoće tla (smanjenje volumnog udjela pora u tlu) smanjuje njihovu aktivnost, ali i biomasu (Arrázola-Vásquez i sur., 2022; Söchtig i Larink, 1992). Svjetlost također utječe na ponašanje vrsta koje se hrane ili žive blizu površine tla, poput anecičnih gujavica koje noću izlaze na površinu u potrazi za hranom (Nuutinen i sur., 2014). Gujavice detektiraju svjetlost pomoću

vidnih stanica raspoređenih po čitavom tijelu, pri čemu kakvoća i količina svjetlosti regulira njihov dnevno-noćni ritam aktivnosti, koji će prekinuti samo u uvjetima gladovanja (Sandhu i sur., 2018). Osim abiotičkih čimbenika, na ponašanje i aktivnost gujavica utječu i biotički čimbenici poput strategija hranjenja, razmnožavanja, razvojnog stadija i interakcija između vrsta. Na primjer, *L. terrestris* redovito izlazi na površinu u potrazi za hranom i može prijeći do 19 m u jednoj noći (Mather i Christensen, 1988), dok *A. caliginosa* ostaje u gornjim slojevima tla i hrani se izravno iz tla (Felten i Emmerling, 2009).

Zbog stalnog kontakta s tlom, kako putem kože tako i putem probavnog sustava, gujavice su osjetljive na prisutnost zagađivala u tlu te se smatraju indikatorima stanja u okolišu (Spurgeon i sur., 2000). Korištenje gujavica u ekotoksikološkim istraživanjima omogućuje procjenu letalnih i subletalnih učinaka zagađivala na terestričke organizme i zdravlje tla (Fründ i sur., 2011).

Uz prethodno navedene abiotičke i biotičke čimbenike, prisutnost kemijskih zagađivala u tlu također utječe na aktivnost i ponašanje gujavica (Capowiez i sur., 2003; Roeben i sur., 2020). Budući da su zagađivala često prisutna u koncentracijama koje ne uzrokuju smrt organizama, u procjeni rizika za okoliš (eng. *environmental risk assessment*) sve je veći fokus na biomarkerima izloženosti subletalnim koncentracijama zagađivala. Biomarkeri su definirani kao biološki odgovori (biokemijski, stanični, fiziološki, populacijski i dr.) koji omogućuju procjenu izloženosti toksičnim spojevima (Peakall, 1994; Vasseur i sur., 2021; Walker i sur., 2012). Zbog brojnih važnih uloga u tlu i utvrđene osjetljivosti na prisutnost relativno niskih koncentracija zagađivala, gujavice se smatraju indikatorima stanja okoliša i koriste se u standardnim ekotoksikološkim testovima prema smjernicama OECD-a i ISO-a. Najčešće korišteni biomarkeri izloženosti su promjene u aktivnosti pojedinih enzima (npr. AChE, SOD, CAT i dr.), smrtnost, promjene u reproduktivnom uspjehu, dinamici rasta i sl. uslijed izloženosti zagađivalu. Istraživanja su pokazala kako izloženost gujavica teškim metalima, poput olova i kadmija, značajno smanjuje reproduktivnu sposobnost, uzrokuje oksidativni stres te inhibira aktivnost gujavica, što posljedično ima izrazito nepovoljne učinke na cjelokupni ekološki sustav (Yadav i sur., 2023).

2.2.1.1. Gujavice i procjena učinaka pesticida

Pesticidi u poljoprivredi predstavljaju glavni izvor zagađenja tla (FAO i UNEP, 2021). Gujavice su važan bioindikator u procjeni učinaka pesticida na različitim ekološkim razinama. One omogućuju procjenu učinaka na razini jedinki, populacija i ekoloških sustava. Analiza

biomarkera u gujavica, poput enzimske aktivnosti, genotoksičnosti i oksidativnog stresa, omogućuje razumijevanje toksičnih učinaka na jedinke. Promjene u ovim biomarkerima ukazuju na štetne učinke pesticida na gujavice, a koje se očituju kroz oštećenja DNA i inhibiciju enzima odgovornih za detoksikaciju. Na primjer, enzimi poput AChE i GST često se koriste za procjenu neurotoksičnih i detoksikacijskih učinaka pesticida. Organofosfatni i karbamatni pesticidi inhibiraju aktivnost AChE, ključnog enzima za prijenos živčanih impulsa. Studije su pokazale da izlaganje organofosfatima, poput dimetoata, može značajno smanjiti aktivnost AChE kod vrste *E. fetida*, što uzrokuje neurotoksičnost i smanjenu pokretljivost (Miglani i Bisht, 2019). GST ima važnu ulogu u detoksikaciji pesticida. Istraživanja su pokazala da izloženost pesticidima povećava aktivnost GST-a kao odgovor na oksidativni stres, što može dovesti do iscrpljivanja rezervi glutationa i oštećenja stanica (Tiwari i sur., 2016). U opsežnom istraživanju koje je uključivalo 45 pesticida iz različitih kemijskih skupina, Wang i sur. (2012) utvrdili su izrazito visok stupanj toksičnosti (LC50 niže od 10 µg/cm²) nekih pesticida, poput klotianidina i fenpiroksimata, dok su herbicidi poput glifosata pokazali relativno nisku toksičnost. Istraživanje je također otkrilo razlike u toksičnosti između različitih skupina pesticida, pri čemu je najveća toksičnost utvrđena za insekticide i fungicide, općenito. Pesticidi također induciraju oksidativni stres kod gujavica, što dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Ove molekule uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA i proteina, što može smanjiti preživljavanje gujavica u kontaminiranom tlu. Studije su pokazale da katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD), ključni enzimi u obrani od oksidativnog stresa, pokazuju povećanu aktivnost kao odgovor na izloženost pesticidima (Pelosi i sur., 2014).

Gujavice se također koriste za praćenje učinaka pesticida na razini populacije kroz analizu reproduktivne uspješnosti, rasta i preživljavanja. Smanjenje broja jedinki, smanjena plodnost ili povećana stopa smrtnosti ukazuju na potencijalne ekološke rizike koje pesticidi predstavljaju za populaciju gujavica (Miglani i Bisht, 2019). Pawar i Shahezad (2013) utvrdili su kako niže koncentracije organofosfatnog insekticida klorpirifosa pokazuju slabiji učinak na rast gujavica tijekom 7 i 14 dana, no značajno inhibiraju rast pri duljoj izloženosti (dulje od 14 dana). Booth i O'Halloran (2001) utvrdili su značajno smanjenje stope rasta jedinki vrste *Aporrectodea caliginosa* pri izloženosti dvama organofosfatima, diazinonu i klorpirifosu, pri koncentracijama od 28 i 60 kg/ha. Malation, također organofosfat, značajno utječe na smanjenje tjelesne mase i ima negativan utjecaj na muške reproduktivne organe, uključujući promjene u staničnoj proliferaciji i strukturi DNA spermatogonija kod gujavica

(Espinoza-Navarro i Bustos-Obregón, 2005). Broj spermija također se pokazao osjetljivim markerom izloženosti. Smanjenje broja spermija utvrđeno je kao posljedica izloženosti malationu, no njegovi metaboliti također mogu utjecati na kvalitetu spermija (Espinoza-Navarro i Bustos-Obregón, 2005). Rajashree i Reddy (2014) utvrdili su toksične učinke metil-parationa i forata na gujavice, koje se očituju kroz progresivne simptome toksičnosti poput uvijanja, prekomjernog lučenja sluzi, tromih pokreta, oticanja klitela, degenerativnih promjena u živčanom sustavu i gubitka pigmentacije.

Na razini ekosustava, gujavice služe kao pokazatelji općeg zdravlja tla, jer one imaju važnu ulogu u razgradnji organske tvari i stvaranju humusa (Edwards i Arancon, 2022). Gubitak biološke aktivnosti u tlu zbog pesticida može se pratiti kroz smanjenje aktivnosti gujavica i promjene u strukturi populacije koje na kraju utječu na cijeli ekosustav tla, uključujući druge organizme ovisne o procesima razgradnje tla (Beaumelle i sur., 2021, 2023). Istraživanje provedeno u Francuskoj na uzorcima tla iz područja na kojima je poljoprivreda dominantna aktivnost pokazalo je prisutnost barem jednog pesticida u svim analiziranim uzorcima tla ($n = 180$) te u 92% analiziranih gujavica ($n = 155$), čak i u staništima koja nisu izravno tretirana pesticidima, poput živica, travnjaka i usjeva pod ekološkim uzgojem. Zagađenje mješavinama barem jednog insekticida, herbicida i fungicida zabilježena je u 90% uzoraka tla i 54% analiziranih gujavica, često u koncentracijama koje predstavljaju ozbiljan rizik za gujavice i čitave zajednice organizama tla (Pelosi i sur., 2021). Izvješća Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) istaknula su potrebu za proširenjem ekološke procjene rizika od pesticida, s većim naglaskom na utjecaje kemikalija na bioraznolikost u stvarnim terenskim uvjetima (Axelman i sur., 2024). Istraživanje Amossé i sur. (2020) provedeno je u okolišu tijekom 24 mjeseca, a ispitalo je učinke dviju komercijalnih formulacija fungicida na zajednice gujavice, pri pojedinačnim tretmanima i u primjenom mješavina fungicida. Rezultati su pokazali značajno smanjenje bioraznolikosti vrsta, brojnosti i biomase gujavica nakon tretmana visokim dozama jednog od fungicida, gdje je zabilježeno smanjenje Shannonovog indeksa raznolikosti na 54% u odnosu na kontrolu tijekom prvih 18 mjeseci pokusa. Slično tome, kombinirani tretmani preporučenim dozama oba fungicida uzrokovali su pad indeksa raznolikosti na 68% kontrole u prvih šest mjeseci. Među vrstama gujavica, *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea giardi*, *Aporrectodea longa* i *Allolobophora chlorotica* bile su najosjetljivije na prisutnost fungicida, što ukazuje na varijabilnu otpornost među vrstama. Ovo istraživanje ne samo da je pružilo vrijedne uvide u ekotoksikološke učinke fungicida na razini zajednica i njihove sposobnosti oporavka, već je i ukazalo na

metodološke slabosti u smjernicama za određivanje učinaka pesticida u terenskim uvjetima. Posebno su naglašeni izazovi u vezi s koncentracijama fungicida u tlu i statističkom obradom podataka, što ukazuje na potrebu za daljnjim unapređenjem ovih procjena kako bi se osigurala veća preciznost i relevantnost rezultata.

2.2.1.2. Izbjegavanje kontaminiranih područja kao bihevioristički biomarker

Ponašanje izbjegavanja jedna je od često proučavanih reakcija na subletalne koncentracije zagađivala, a test izbjegavanja danas je standardizirani dio ekotoksikoloških istraživanja (ISO, 2008). Bihevioristički testovi, poput izbjegavanja kontaminiranih područja, omogućuju procjenu subletalnih učinaka zagađivala (Hund-Rinke i Wiechering, 2001). Test izbjegavanja provodi se u posudama s odjeljcima za kontrolno i zagađeno tlo, omogućujući migraciju organizama i kvantifikaciju izbjegavanja zagađivala (ISO, 2008). Ova metoda je brza, osjetljiva i jednostavna za izvedbu. Garcia i sur. (2008) istražili su utjecaj triju pesticida (benomil, karbendazim i lambda-cyhalothrin) na ponašanje izbjegavanja gujavica vrste *E. fetida* u laboratorijskim uvjetima, simulirajući umjerene i tropske uvjete. U istraživanju je korišteno nekoliko različitih tipova tala. Jedan od ciljeva bio je usporediti osjetljivost testova izbjegavanja s akutnim i kroničnim testovima toksičnosti. Gujavice su bile izložene sedam različitih koncentracija pesticida kroz 48 sati, a bilježeno je njihovo kretanje između zagađenog i kontrolnog tla. Rezultati su pokazali kako je test izbjegavanja osjetljiviji od akutnog testa, a rezultati testa izbjegavanja su u velikoj mjeri usporedivi s rezultatima kroničnih testova. Intenzitet izbjegavanja zagađenog tla ovisio je o tipu tla, okolišnim uvjetima (npr. temperatura i pH tla) i testiranom pesticidu. Temeljem rezultata istraživanja, test izbjegavanja preporučen je kao brza i učinkovita metoda za preliminarne procjene rizika pesticida. Sličan zaključak donesen je i na temelju istraživanja izbjegavanja prirodnog tla porijeklom s visoravni u Kolumbiji, u kojem je ispitano izbjegavanje medija zagađenog karbofuranom, klorpirifosom, mankozebom i metamidofosom (García-Santos i Keller-Forrer, 2011). Jednoznačan doza-odgovor tip odgovora izbjegavanja utvrđen je za klorpirifos i karbofuran, pri čemu je koncentracija koja je uzrokovala 50% izbjegavanja (AC50) iznosila 34,16 mg/kg klorpirifosa i 15,05 mg/kg karbofurana, dok u slučaju preostala dva ispitana pesticida AC50 nije bilo moguće odrediti. Testovi provedeni na terenu potvrdili su rezultate dobivene u laboratoriju za klorpirifos i mankozeb, dok su razlike zabilježene za karbofuran i metamidofos, što se može pripisati različitim uvjetima tla i temperature. Ovo istraživanje naglasilo je važnost prilagodbe testova lokalnim uvjetima tla i okoliša te preporučuje provođenje daljnjih studija kako bi se unaprijedilo razumijevanje subletalnih učinaka pesticida

u tropskim predjelima. Test izbjegavanja često se koristi u kombinaciji s drugim ekotoksikološkim metodama, poput testova akutne i reproduktivne toksičnosti, kako bi se pružila sveobuhvatna procjena učinaka zagađivala na organizme i funkcionalnost ekosustava. Tako su, primjerice, Wang i sur. (2019) istražili učinke neonikotinoidnog insekticida imidakloprida na gujavice (*E. fetida*) kroz niz testova, uključujući akutnu toksičnost, test izbjegavanja, reproduktivnu toksičnost, aktivnosti detoksifikacijskih enzima i analizu ekspresije gena. Cilj istraživanja bio je obuhvatiti višerazinske ekotoksikološke učinke ovog pesticida na gujavice i identificirati osjetljive biomarkere za procjenu rizika. LC50 vrijednost za 14 dana bila je 2,26 mg/kg suhog tla, što IMI klasificira kao umjereno toksičan za gujavice. Mortalitet je bio povezan s koncentracijom i duljinom izlaganja. AC50 vrijednost (koncentracija koja inducira 50% izbjegavanja) iznosila je 1,34 mg/kg nakon 48 sati. EC50 vrijednost za reprodukciju (broj juvenilnih jedinki) iznosila je 0,87 mg/kg za 56 dana izlaganja. Rast i reprodukcija gujavica pokazali su opadajući trend s porastom koncentracije IMI-a, uz značajnu inhibiciju u tretmanima s visokim koncentracijama. Aktivnosti karboksilesteraze (CarE) i glutation-S-transferaze (GST) bile su narušene. CarE je bio osjetljiviji marker u ranijim fazama izlaganja, dok su fluktuacije GST-a bile izraženije kasnije. Geni povezani s reprodukcijom (annetocin), zaštitnim funkcijama (calreticulin i hsp70), i detoksifikacijom (gst) pokazali su značajne promjene ekspresije ovisno o koncentraciji i vremenu izlaganja. Ovo istraživanje potvrdilo je višestruke štetne učinke imidakloprida na gujavice, pri čemu je reprodukcija identificirana kao najosjetljivija krajnja točka. Test izbjegavanja istaknuo se kao brz i učinkovit alat za rano otkrivanje zagađenja, dok su molekularni biomarkeri pružili dublje razumijevanje toksičnih mehanizama. Ovi rezultati naglašavaju potrebu za integriranim pristupom u procjeni rizika pesticida kako bi se zaštitile neciljane vrste i osigurao održivi razvoj tla. Yadav i sur. (2020) istražilo je učinke dvaju pesticida, klorpirifosa (organofosfat) i karbofurana (karbamat), na gujavice vrste *E. fetida* kroz analizu morfoloških, biheviorističkih i biokemijskih biomarkera. Proveden je standardni test kontaktne toksičnosti na filter papiru te test izbjegavanja. Utvrđeno je značajno izbjegavanje pesticidima zagađenih tala čak i pri niskim koncentracijama klorpirifosa (0,13%) i karbofurana (2,57%), što ukazuje na sposobnosti detekcije i izbjegavanja toksičnih tvari u tlu. Glede morfoloških promjena, izloženost pesticidima izazvala je abnormalne simptome poput prekomjernog izlučivanja sluzi, gubitka pigmentacije, deformacija tijela, oštećenja kliteluma i oštećenja kolutića. Ti simptomi bili su izraženiji kod gujavica izloženih klorpirifosu. Također su zabilježeni smanjenje aktivnosti i usporeni pokreti pri nižim koncentracijama oba pesticida, dok su više koncentracije klorpirifosa izazvale nemir i trzajuće

pokrete. Kod karbofurana je primijećeno intenzivno uvijanje tijela kao reakcija na prisutnost zagađivala. Aktivnost AChE smanjivala se ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti, pri čemu je snažnija inhibicija AChE utvrđena pri izloženosti klorpirifosu. Test izbjegavanja se istaknuo kao osjetljiva metoda za otkrivanje subletalnih učinaka pesticida, dok je inhibicija aktivnosti AChE utvrđena kao ključni biomarker neurotoksičnosti ovih pesticida, pružajući vrijedne podatke za procjenu rizika i upravljanje kontaminacijom tla.

2.2.2. Vodenbuhe (*Daphniidae*) u ekotoksikološkim istraživanjima

Vodenbuhe, mali planktonski rakovi, a posebno *D. magna*, često se koriste kao modelni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima akvatičkih ekosustava zbog svoje osjetljivosti na zagađivala i ekološke važnosti (Abdullahi i sur., 2022; Ebert, 2022; Persoone i sur., 2009). Zbog svoje široke rasprostranjenosti i osjetljivosti na kemikalije, vodenbuhe su idealni modelni organizmi za procjenu toksičnosti zagađivala poput pesticida (Erickson i sur., 2014), teških metala (Qin i sur., 2024), nanočestica (Reilly i sur., 2023) i mikroplastike (Yin i sur., 2023).

Test akutne toksičnosti s vodenbuhama (*D. magna*) jedan je od najčešće korištenih bioeseja za procjenu toksičnosti kemikalija i kontaminiranih voda. Njegova popularnost temelji se na širokoj rasprostranjenosti *D. magna* u prirodi, njihovom kratkom životnom ciklusu i relativno jednostavnom uzgoju u laboratorijskim uvjetima. Tijekom desetljeća, razvijeni su standardizirani protokoli koji su odobreni na nacionalnoj i međunarodnoj razini, čime je ovaj tip testa postao ključan u regulatornim okvirima za procjenu rizika (Persoone i sur., 2009). OECD standardi koriste vodenbuhe za procjenu toksičnosti u vodi, uključujući testove pokretljivosti (OECD, 2004) i razmnožavanja (OECD, 2012). Tradicionalni testovi zahtijevaju održavanje stabilnih kultura *D. magna* u laboratorijima, što može biti skupo i logistički zahtjevno. Kako bi se zaobišli ti izazovi, razvijeni su tzv. mikrobiotestovi koji koriste dormantna jaja (ephippia). Ova metoda omogućuje dugotrajno skladištenje jaja, koja se mogu izlegnuti prema potrebi za izvođenje testova. Mikrobiotestovi, poput Daphtokit F magna, pokazali su usporedivu osjetljivost i preciznost u odnosu na tradicionalne testove, uz smanjenje troškova i logističkih izazova vezanih uz održavanje kultura (Persoone i sur., 2009). Upotreba mikrobiotestova ne samo da je smanjila potrebu za održavanjem kultura, već je i povećala dostupnost metoda za istraživanja i praćenje toksičnosti diljem svijeta. Ova tehnologija postala je ključna za istraživanja ekotoksičnosti u laboratorijima koji nemaju

resurse za uzgoj organizama tijekom cijele godine, čime doprinosi globalnom standardiziranju i širenju ekotoksikoloških istraživanja.

Abdullahi i sur. (2022) predlažu inovativan trostupanjski okvir koji koristi *D. magna* kao sentinel vrstu za procjenu opasnosti kemijskih mješavina iz stvarnog okoliša i identifikaciju ključnih molekularnih događaja (eng. *putative molecular key events*, mKEs) povezanih s toksičnošću. Ovaj okvir omogućuje povezivanje toksičnih učinaka između različitih vrsta putem funkcionalno konzerviranih mreža gena i metabolita, što vodi prema *in vivo* i *in vitro* validacijama toksičnih učinaka u ljudskim modelima. Prva razina okvira uključuje netargetiranu analizu kemijskih "otisaka" mješavina i bioloških odgovora pomoću omics tehnologija, poput transkriptomike i metabolomike. Nakon izlaganja vodenbuha mješavinama, prikupljaju se uzorci tkiva za mjerenje promjena ekspresije gena i metabolita, što omogućuje detekciju potencijalno toksičnih komponenti. Druga razina identificira mKEs povezanih s toksičnim učincima komponenti mješavina zagađivala. Treća razina povezuje identificirane bioaktivne komponente s molekularnim učincima i omogućuje validaciju rezultata u ljudskim i drugim modelima. Integracijom podataka o bioaktivnim komponentama mješavina i mKEs identificiranih kroz molekularne analize, predloženi okvir omogućuje sveobuhvatno razumijevanje povezanosti između kemijskih zagađivača i njihovih bioloških učinaka. Ovakav pristup doprinosi preciznijem prepoznavanju toksičnih spojeva i mehanizama djelovanja, što predstavlja značajan napredak u procjeni rizika i upravljanju kemijskim zagađenjem okoliša.

Reproduktivni biomarkeri važan su element u procjeni subletalnih učinaka zagađivala (OECD, 2012). Pri povoljnim okolišnim uvjetima, koji uključuju optimalni raspon temperature (18–22 °C), pH (6–9) i zasićenost otopljenim kisikom (>6 mg L⁻¹), razmnožavanje vrsta iz roda *Daphnia* je partenogenetsko (Ebert, 2005). Partenogeneza je oblik nespolnog razmnožavanja (Ebert, 2005) (prema nekim autorima nepotpuni oblik spolnog razmnožavanja (Boyden, 1950)) u kojem se iz neoplođene jajne stanice razvija nova jedinka. Uslijed ovog oblika razmnožavanja nastaju genetski identični klonovi roditeljske jedinke (majke). Proces partenogeneze se nastavlja dok okolišni uvjeti podržavaju rast jedinki i njihovo razmnožavanje. Međutim, pod stresnim uvjetima, kao što su prekomjerna gustoća populacije, nedostatak hrane, izloženost zagađivalima ili promjene u abiotičkim čimbenicima poput temperature i pH, razmnožavanje vodenbuha mijenja se u spolno. Spolno razmnožavanje kod vodenbuha uključuje proizvodnju efipija, ili dormantnih jaja, koja mogu preživjeti u sedimentu dugi niz godina. Ova jaja služe kao zaštitni mehanizam, omogućujući opstanak populacije uslijed nepovoljnih uvjeta i ponovnu aktivaciju uslijed ponovnog

nastupanja povoljnih uvjeta. Ova prilagodba ne samo da osigurava dugoročni opstanak populacije nego i predstavlja osjetljiv biomarker za procjenu stresa uzrokovanog zagađivalima (Reilly i sur., 2023). Izloženost zagađivalima, poput teških metala, pesticida ili farmaceutika, može poremetiti ravnotežu između partenogeneze i spolnog razmnožavanja. Takvi učinci pružaju uvid u mehanizme toksičnosti i omogućuju precizniju procjenu rizika za populacije u prirodi. Promjena u reproduktivnoj strategiji, kao što je povećana proizvodnja efipija, ukazuje na subletalne učinke zagađivala koji se možda ne bi mogli detektirati drugim metodama. Omjer između zastupljenosti partneogenetskog i spolnog razmnožavanja moguće je odrediti analizom strukture populacije i prebrojavanjem efipija. Također, genetske analize mogu pomoći u utvrđivanju omjera između potomaka nastalih iz partenogenetskog i spolnog reproduktivnog ciklusa, dok analiza transkriptoma omogućuje određivanje omjera ženki uključenih u partenogenetski i spolni način razmnožavanja. Navedene tehnike omogućuju procjenu stupnja zastupljenosti partenogeneze u populaciji. Uključivanjem reproduktivnih biomarkera u ekotoksikološka istraživanja, moguće je bolje razumjeti utjecaj zagađivala na populacije i ekosustave te unaprijediti strategije upravljanja i očuvanja okoliša. Zahvaljujući prilagodljivosti glede reproduktivne strategije, *D. magna*, ostaje ključni modelni organizam u ovim procjenama, povezujući molekularne odgovore s promjenama na populacijskoj razini (Ebert, 2022; Persoone i sur., 2009; Reilly i sur., 2023).

Primjerice, Dang i sur. (2012) istražili su primjenu 21-dnevnog testa razmnožavanja s vrstom *D. magna* za identifikaciju i procjenu rizika endokrinih disruptora. Test, koji je ključan u OECD-ovom konceptualnom okviru za testiranje toksičnosti, procjenjuje više apikalnih krajnjih točaka, uključujući preživljavanje, rast, presvlačenje, spolnu zrelost, broj reproduktivnih ciklusa, ukupni broj potomaka i omjer spolova. Analiza 135 studija koje su uključivale 86 kemikalija s različitim mehanizmima djelovanja pokazala je da većina krajnjih točaka nije specifična za endokrine disruptore, osim omjera spolova, koji je povezan s juvenilnim hormonima i njihovim mimeticima. Utvrđeno je da je osjetljivost omjera spolova niža od osjetljivosti ukupnog broja potomaka, što ukazuje na ograničenja u detekciji učinaka endokrinih disruptora. Rezultati su također pokazali varijabilnost u učincima među laboratorijima, osobito za određene kemikalije poput bisfenola A i 3,5-diklorofenola. Autori zaključuju da sam 21-dnevni test s *D. magna* nije dovoljan za identifikaciju endokrinih disruptora, ali je važan za određivanje NOEC (koncentracije bez opaženih učinaka) u procjeni rizika za okoliš. Preporučuju integrirani pristup koji uključuje testove na drugim vrstama, *in*

vitro testove i QSAR analize kako bi se poboljšala identifikacija i regulacija endokrinih disruptora.

Biokemijski biomarkeri, poput aktivnosti AChE, glutation-S-transferaze (GST) i CAT, ključni su alati u ekotoksikologiji jer omogućuju rano otkrivanje subletalnih učinaka zagađivala na organizme, pružajući uvid u mehanizme toksičnosti na molekularnoj i staničnoj razini. Jemec i sur. (2007) istražili su primjenjivost AChE i GST kao biomarkera u standardnim akutnim testovima toksičnosti na *D. magna* pri izlaganju kromu, kadmiju i diazinonu. Rezultati su pokazali da se promjene aktivnosti enzima nisu dosljedno povezivale s imobilizacijom organizama, što ograničava upotrebu ovih biomarkera kao rutinskih alata u akutnim testovima toksičnosti. Povećana aktivnost AChE u prisutnosti kadmija sugerirala je hormetički učinak, dok diazinon nije pokazao značajne promjene aktivnosti AChE ili GST pri testiranim koncentracijama. Kasnije istraživanje ove istraživačke grupe nadovezuje se na ovu temu, analizirajući intrinzična svojstva biomarkera, katalaze (CAT), GST i kolinesteraze (ChE), u *D. magna* i kopnenog raka *Porcellio scaber* (Jemec i sur., 2010). Autori ističu kako, iako su biokemijski biomarkeri obećavajući za identificiranje mehanizama toksičnosti, njihova osjetljivost i povezanost s učincima na razini organizma variraju ovisno o vrsti kemikalije, trajanju izlaganja i testiranim vrstama. Rad zaključuje da je upotreba ovih biomarkera moguća u detekciji opasnosti, dok njihova primjena za karakterizaciju rizika zahtijeva dodatnu standardizaciju i validaciju. Zajednički doprinos ovih radova jest prepoznavanje ograničenja i potencijala biokemijskih biomarkera u ekotoksikološkim studijama te poziv na integraciju novih tehnologija, poput „omics“ pristupa, za unaprjeđenje procjena rizika u okolišu. „Omics“ pristup u biologiji i ekotoksikologiji odnosi se na analizu kompleksnih bioloških sustava na molekularnoj razini, koristeći visokoprotočne tehnologije za proučavanje genoma, transkriptoma, proteoma, metaboloma i drugih „-oma“ (Prat i Degli-Esposti, 2019). Primjena „omics“ pristupa u ekotoksikologiji omogućuje rano otkrivanje biomarkera toksičnosti, pruža uvid u mehanizme djelovanja zagađivala te povezuje molekularne promjene s učincima na razini organizama, populacija i ekosustava. Ovaj integrativni alat postaje ključan za razumijevanje i upravljanje rizicima u okolišu (Ebner, 2021; Zhang i sur., 2018).

2.2.2.1. Vodenbuhe i procjena učinaka pesticida

Prekomjerna upotreba pesticida, uključujući herbicide, fungicide i insekticide, značajno doprinosi kontaminaciji tla i voda, uzrokujući neželjene posljedice na okoliš - od razine

organizma do razine čitavih ekosustava (Liess i Schulz, 1999; Zaller i Brühl, 2019). Pesticidi korišteni u poljoprivrednim sustavima često dospijevaju u površinske vode putem otjecanja uzrokovanog kišom, prskanja ili prijenosa sedimenta, čime ugrožavaju neciljne vodene organizme (Schulz, 2004; Racke, 2003). Procjena učinaka pesticida na *D. magna* uključuje akutne testove koji omogućuju brzo otkrivanje neposrednih učinaka i subkronične testove koji otkrivaju dugoročne posljedice, poput reproduktivnih poremećaja ili kumulativne toksičnosti (Dang i sur., 2012; OECD, 2004, 2012; Persoone i sur., 2009). Korištenje ovih testova ključ je za razumijevanje rizika pesticida za akvatične ekosustave i razvoj učinkovitih strategija upravljanja zagađenjem.

Istraživanja daju uvid u različite odgovore ovih organizama na širok spektar pesticida. U istraživanju Matsumoto i sur. (2009), procijenjena je akutna i subkronična toksičnost trideset kemikalija, uključujući insekticide, fungicide i herbicide. Akutnim testovima toksičnosti otkrivena je visoka toksičnost insekticida. Nasuprot tome, većina testiranih herbicida i fungicida pokazala je nižu toksičnost. Međutim, određene kemikalije poput kloronitrofena i fenitrotiona pokazale su sporodjelujuće toksične učinke koji su postajali izraženiji nakon dužeg perioda izlaganja, ukazujući na potencijalne subkronične rizike. Značajan utjecaj na razmnožavanje zabilježen je u dugoročnijim testovima, sugerirajući da neke kemikalije mogu djelovati kao endokrini disruptori. Razina toksičnosti pesticida ne ovisi samo o skupini pesticida, već i o generaciji spojeva. Tako su, primjerice, Mokry i Hoagland (1990) usporedili akutnu toksičnost pet sintetičkih piretroida novije generacije i permetrina, prvog komercijalno dostupnog piretroida. Za piretroide novije generacije utvrđen je snažniji toksični učinak u vidu nižih LC50 vrijednosti u usporedbi s permetrinom. Otkriveno je kako su piretroidi poput tralometrina i ciflutrina posebno toksični, što ukazuje na povećanu biološku aktivnost uslijed strukturnih modifikacija koje poboljšavaju stabilnost i toksičnost tih spojeva. Nepovoljni učinak pesticida odražava se kroz izbjegavanje zagađenih područja. Pesticidi fipronil i herbicid 2,4-D utječu na ponašanje izbjegavanja i osobine životnog ciklusa vodenbuha (Moreira i sur., 2023). Uporabom HeMHAS (eng. *Heterogenous Multi-Habitat Assay System*) sustava za simulaciju različitih stupnjeva kontaminacije staništa, ustanovljeno je kako *D. magna* ne izbjegava zagađena područja. To rezultira otežanom kolonizacijom novih staništa i može dovesti do rizika od lokalnog izumiranja. Dugotrajna izloženost fipronilu posebno je zabrinjavajuća jer je zabilježeno smanjenje duljine tijela, plodnosti i životnog vijeka, ukazujući na potencijalne endokrine i reproduktivne poremećaje u vodenbuha.

Vodeni organizmi poput vodenbuha (*D. magna*) redovito su izloženi složenim mješavinama pesticida čiji se sastav mijenja s vremenom, povećavajući rizik od akutnih i kroničnih učinaka. Ovi učinci se detaljno istražuju u studijama koje prikazuju dinamiku promjene sastava mješavina i njihovih učinaka na ekosustave (Posthuma i sur., 2019; Nowell i sur., 2018; Gustavsson i sur., 2017). Metodološki pristupi za procjenu toksičnosti mješavina pesticida, kao što su modeli koncentracijske adicije (CA) i neovisnog djelovanja (IA), često su neadekvatni za predviđanje interakcija poput sinergizma i antagonizma između komponenti (Rodney i sur., 2013). Napredniji modeli koji uključuju toksikokinetičke i toksikodinamičke parametre, primjerice modeli temeljeni na teoriji dinamičkog energetskog budžeta (DEB), pomažu u boljem razumijevanju utjecaja pesticida na različite fiziološke procese organizama, poput rasta i reprodukcije. Ovi modeli pružaju temeljitije analize učinaka mješavina na organizme i omogućuju realniju procjenu dugoročnih posljedica (Rodney i sur., 2013).

Specifični primjeri iz recentnih istraživanja uključuju studije koje istražuju interakcije unutar binarnih i ternarnih mješavina pesticida. Na primjer, Loureiro i sur. (2010) pokazali su kako mješavine imidakloprida i tiakloprida mogu imati sinergističke učinke u pojedinim akutnim testovima na *D. magna*, dok su kod drugih istraženih mješavina uočeni antagonistički učinci. Slično, Qiu et al. (2017) koristili su model "accelerated failure time" za procjenu interakcija unutar mješavina pesticida diazinon, fenitrothion i tiobenkarb, otkrivajući sinergizam u nekim binarnim kombinacijama, dok su u ternarnim mješavinama učinci varirali ovisno o koncentraciji i omjerima spojeva. Istraživanja naglašavaju složenost ekotoksikološke dinamike pesticida i potrebu za sveobuhvatnim pristupima u procjeni njihovih učinaka na akvatične ekosustave. Integracija rezultata laboratorijskih i terenskih istraživanja ističe se kao ključ za razumijevanje stvarnih rizika pesticida, posebno kada su u pitanju sinergistički i antagonistički učinci među različitim kemikalijama (Rodney i sur., 2013; Loureiro i sur., 2010; Qiu i sur., 2017). Ovi nalazi podržavaju potrebu za standardizacijom metodologija i razvojem višerazinskih pristupa koji uzimaju u obzir različite krajnje točke, poput smrtnosti, reprodukcije i bihevioralnih promjena, kako bi se osiguralo točnije procjenjivanje utjecaja pesticida na vodene organizme i ekosustave.

2.2.2.2. Bihevioristički biomarkeri vodenbuha

Istraživanja pokazuju kako uobičajeno mjerene krajnje točke, poput smrtnosti i imobilizacije, nisu uvijek dovoljno osjetljive za otkrivanje subletalnih učinaka, osobito pri niskim koncentracijama zagađivala (Duquesne i Küster, 2010). U tom kontekstu, kvantifikacija

parametara aktivnosti plivanja vodenbuha predstavlja inovativan i osjetljiv alat za detekciju promjena uzrokovanih različitim zagađivalima, uključujući pesticide, teške metale, nanočestice i druge spojeva prisutnih u prirodi poput toksina cijanobakterija (Bownik, 2017). Parametri poput brzine plivanja, trajanja kretanja, frekvencije skakanja i smjera kretanja pružaju detaljan uvid u učinke različitih zagađivala. Na primjer, studije su pokazale da nanočestice titana i grafena značajno smanjuju brzinu plivanja u *D. magna* (Noss, Dabrunz, i sur., 2013), dok cijanotoksin saksitoksin izaziva imobilizaciju zbog blokade natrijevih kanala (Filho i sur., 2008). S druge strane, spojevi poput sukraloze, koja djeluje na živčani sustav, mogu izazvati povećanje brzine plivanja (Wiklund i sur., 2012). Neurotoksični pesticidi, poput paraokson-metila i karbarila, također mijenjaju obrasce kretanja, što upućuje na oštećenje živčanog sustava (Dodson i sur., 1995). U radu Bownik (2017) dan je iscrpan i detaljan pregled najčešće korištenih biheviorističkih krajnjih točaka vrsta iz roda *Daphnia* u okviru ekotoksikoloških istraživanja. Brzina plivanja mjeri se kao prijeđena udaljenost tijekom vremena i često se koristi kao pouzdan indikator toksičnosti. Smanjenje brzine plivanja opaženo je kod vodenbuha izloženih nanočesticama, poput titan-dioksida i ugljikovih nanocijevi, koje djeluju na razinu oksidativnog stresa (Cano i sur., 2017; Noss, Dabrunz, i sur., 2013). Također, smanjenje brzine opaženo je prilikom izloženosti pesticidima poput organofosfata (npr. klorpirifosa) zbog inhibicije enzima AChE (Ren i sur., 2017), dok su spojevi poput sukraloze povećali brzinu plivanja uslijed stimulirajućeg djelovanja na živčani sustav (Wiklund i sur., 2012). Kretanje vodenbuha može se karakterizirati kao skokovito, zahvaljujući ritmičnom radu antena (Ebert, 2005). Smanjenje frekvencije skokova može ukazivati na inhibiciju neuromuskularne funkcije, što je zabilježeno kod izloženosti pesticidima poput karbarila (Dodson i sur., 1995). S druge strane, nanočestice fullerena povećale su broj skokova u jedinici vremena kao odgovor na stres (Lovern i sur., 2007). Parametri kretanja poput vertikalne i horizontalne distribucije mjere položaj jedinki u vodenom stupcu ili prostoru. Na primjer, povećana izloženost toksinima, poput cijanobakterijskih toksina, može uzrokovati migriranje vodenbuha prema dnu kako bi izbjegle slojeve vodenog stupca u kojem se nalazi zagađivalo (Filho i sur., 2008). Sukraloza, pak, stimulira plivanje prema višim dijelovima vodenog stupca (Wiklund i sur., 2012). Ukupna udaljenost koju jedinka prijeđe tijekom određenog vremena važna je za procjenu aktivnosti. Organofosfati poput diazinona povećali su prijeđenu udaljenost pri niskim koncentracijama, dok su pri višim koncentracijama izazvali letargiju i skraćivanje trajektorija (Zein i sur., 2015). Trajanje perioda nepokretnosti (ponekad se naziva period odmora) važan je parametar koji može ukazivati na privremenu paralizu uzrokovanu neurotoksičnim spojevima.

Saksitoksin, neurotoksin iz cijanobakterija, uzrokuje produljeno razdoblje nepokretnosti, nakon čega je zabilježena mogućnost oporavka organizama (Filho i sur., 2008). Parametri poput broja promjena smjera i kuta rotacije pomažu u razumijevanju orijentacije vodenbuha u prostoru. Spojevi poput nikotina i imidakloprida smanjuju promjenu kuta, dok organofosfati poput klorpirifosa povećavaju broj promjena smjera zbog gubitka koordinacije (Zein i sur., 2014).

Ponašanje vodenbuha prepoznato je kao vrijedan biomarker u monitoringu zdravlja ekosustava, posebice tijekom terenskih istraživanja. Egan i sur. (2023) proučavali su utjecaj "first flush" događaja, koji se odnosi na ispiranje pesticida u vodene ekosustave nakon prvog pljuska, koristeći klorantraniliprol (CHL) i imidaklopid (IMI) kao modelna zagađivala. Otkriveno je kako su koncentracije oba pesticida značajno porasle nakon pljuska, što je uzrokovalo izražene promjene u ponašanju *D. magna*, poput smanjenja aktivnosti i promjene fotomotornih reakcija. Uslijed izloženosti IMI-ju zabilježena je hipoaktivnost, dok je CHL utjecao na osjetljivost na svjetlosne podražaje. Složene interakcije među pesticidima, evidentirane tijekom eksperimenata s mješavinama, rezultirale su nepredvidivim odgovorima kao što je hiperaktivnost pod svjetlom. Rezultati istraživanja ističu važnost integracije biheviorističkih parametara u ekotoksikološke procjene i naglašavaju potrebu za kontinuiranim monitoringom površinskih voda, osobito u intenzivno poljoprivrednim regijama. Hussain i sur. (2020) istražili su toksičnost dvanaest pesticida na *D. magna* i zebrice (*Danio rerio*) pomoću mjerenja parametara plivanja kao krajnjih točaka za procjenu ekotoksičnih učinaka. Istraživači su koristili metode visokoprotodne analize kretanja kako bi procijenili ukupnu prijeđenu udaljenost, učestalost brzih pokreta ("burst" pokreta) i obrasce plivanja u krug tijekom svjetlosnih i tamnih ciklusa. Za svaki pesticid korištena je koncentracija od 1 ppb, što je tisuću puta niže od koncentracije koja izaziva akutnu toksičnost prema WHO standardima. Prema rezultatima provedenih eksperimenata, većina pesticida izazvala hipoaktivnost kod vodenbuha, dok je kod zebrica utvrđena hiperaktivnost. Uočene su značajne razlike u obrascima kretanja između ovih dviju vrsta, što ukazuje na različite mehanizme djelovanja pesticida. Primjerice, imidaklopid, neonicotinoidni insekticid, izazvao je smanjenu aktivnost kod obje vrste, dok je klorantraniliprol uzrokovao suptilnije promjene u ponašanju. Pesticidi poput cipermetrina i fenprotrina uzrokovali su povećanu učestalost "burst" pokreta kod zebrica, ali smanjenu rotacijsku aktivnost kod vodenbuha. Analizom glavnih komponenata (PCA) i hijerarhijskim klasteriranjem, istraživači su grupirali pesticide prema njihovim efektima na obrasce kretanja i utvrdili dva glavna klastera prema vrsti

kemikalija i njihovim funkcionalnim skupinama. Ovo istraživanje naglašava važnost primjene različitih modelnih organizama kako bi se dobila sveobuhvatnija slika o toksičnosti pesticida. Istraživanje je pokazalo kako se *D. magna* može koristiti za detekciju osjetljivih pokazatelja ranih subletalnih učinaka u vodenim ekosustavima, dok promjene u ponašanju zebrića pružaju uvid u kompleksnije neurološke reakcije. Zaključno, kombinacija podataka iz eksperimenata s obje modelne vrste omogućila je precizniju procjenu ekotoksičnog rizika, naglašavajući potrebu za višedimenzionalnim pristupom u ispitivanju učinaka mješavina pesticida na ponašanje organizama.

Bihevioristički elementi vodenbuha predstavljaju vrijedan biomarker za ekotoksikološka istraživanja, s velikim potencijalom za procjenu kronične toksičnosti i praćenje kvalitete vode. Međutim, za postizanje veće pouzdanosti rezultata potrebno je dodatno unaprijediti metodologiju i integrirati podatke iz laboratorijskih i terenskih istraživanja. Najznačajnija ograničenja koja trenutno postoje su potreba za standardizacijom mjerenja i razvoj te usavršavanje postojećih sustava koji omogućuju praćenje kretanje organizama u 3D, u svrhu postizanja prikladnijih uvjeta za predviđanje kretanja u okolišnim uvjetima. Uključivanje biheviorističkih testova u ekotoksikološka istraživanja omogućuje dobivanje sveobuhvatnijeg uvida u djelovanje zagađivala, budući kako su obuhvaćeni kako fiziološki tako i neurološki odgovori organizama, čime se unaprjeđuje procjena rizika zagađenja vodenih ekosustava.

2.3. Modelna zagađivala

Ekotoksikološka istraživanja često koriste modelna zagađivala u svrhu procjene učinaka kemikalija na organizme i ekosustave. Modelna zagađivala mogu biti čiste aktivne tvari ili komercijalni pripravci koji se koriste u poljoprivredi i industriji (Nagy i sur., 2020). Njihova primjena omogućuje bolju kontrolu eksperimentalnih uvjeta i preciznije povezivanje bioloških učinaka s kemijskim svojstvima spojeva. Međutim, prisutnost velikog broja kemikalija u okolišu i njihovo međusobno djelovanje postavlja izazove u procjeni rizika, jer stvarne kombinacije zagađivala rijetko odražavaju pojedinačne učinke čistih kemikalija (Nilsen i sur., 2019; Schell i sur., 2018; Verbruggen i van den Brink, 2010).

Korištenje čistih aktivnih tvari omogućuje istraživačima razumijevanje mehanizama djelovanja pojedinih kemikalija na fiziološkoj, staničnoj i molekularnoj razini. Primjerice, neonicotinoidi poput imidakloprida često se koriste za istraživanje učinaka na živčani sustav

vodenih organizama jer specifično djeluju na nikotinske acetilkolinске receptore (nAChR) (Tennekes, 2019). Aktivne tvari koriste se za identificiranje ključnih krajnjih točaka, poput inhibicije enzima, gubitka koordinacije ili promjena u reprodukciji. Međutim, iako čiste tvari pružaju uvid u mehanizme toksičnosti, njihova primjena ne odražava stvarne uvjete u okolišu, gdje organizmi dolaze u kontakt s mješavinama kemikalija različitih koncentracija i kemijskih oblika (Nilsen i sur., 2019; Schell i sur., 2018; Verbruggen i van den Brink, 2010). Stoga, istraživanja koja se oslanjaju samo na čiste aktivne tvari mogu podcijeniti ili precijeniti ekološke rizike (Nagy i sur., 2020). S druge strane, istraživanja koja koriste komercijalne pripravke pesticida nastoje bolje odražavati realne uvjete izloženosti. Pripravci ne sadrže samo aktivne tvari već i aditive, surfaktante i stabilizatore koji mogu pojačati ili ublažiti toksične učinke (Tu i Randall, 2001). Na primjer, poznato je da glifosat u obliku komercijalnog pripravka Roundup® ima veću toksičnost za akvatične organizme nego čista aktivna tvar zbog prisutnosti surfaktanata koji povećavaju propusnost staničnih membrana (Klátyik i sur., 2024). Istraživanja koja uključuju komercijalne pripravke pokazuju kako formulacije u praksi često imaju sinergističke učinke koji mogu uzrokovati veće štete nego što se očekivalo na temelju podataka o čistim aktivnim tvarima (Nagy i sur., 2020). Osim toga, formulacije mogu imati drugačiji profil biorazgradnje, čime se mijenja i trajanje njihovog utjecaja u okolišu (Kalyabina i sur., 2021; Ruomeng i sur., 2023). Najcjelovitiji uvid u toksičnost postiže se kombinacijom istraživanja utjecaja čistih aktivnih tvari i komercijalnih pripravaka (Ferguson i sur., 2022). Takav pristup omogućuje prepoznavanje specifičnih mehanizama toksičnosti, ali i uspješniju procjenu stvarnih učinaka zagađivala u okolišu. Kombinacija laboratorijskih eksperimenata s terenskim istraživanjima pruža vrijedne informacije za ekotoksikološke procjene i donošenje regulatornih odluka (Amossé i sur., 2020; Barata i sur., 2007; Buskey i sur., 1996; Heugens i sur., 2001; Nilsen i sur., 2019). Zaključno, iako su istraživanja s čistim aktivnim tvarima ključna za razumijevanje toksičnih mehanizama, korištenje komercijalnih pripravaka neophodno je za realističnu procjenu rizika. Budući da u okolišu često dolazi do interakcija između različitih spojeva, istraživanja koja uključuju modelna zagađivala u obliku mješavina i komercijalnih formulacija sve su važnija za procjenu predviđanje mogućih okolišnih scenarija. Ovakav sveobuhvatan pristup doprinosi razvoju učinkovitijih strategija za zaštitu vodenih ekosustava i ljudskog zdravlja.

2.3.1. Pesticidi kao modelna zagađivala

Pesticidi su sintetičke ili prirodne kemijske tvari namijenjene za kontrolu štetnika u poljoprivredi i drugim industrijama. Iako su usmjereni na ciljne organizme, kao što su insekti i korovi, mogu imati značajne učinke na neciljne organizme, uključujući gujavice i vodenbuhe (He i sur., 2019; Miglani i Bisht, 2019; Stehle i Schulz, 2015). Njihova postojanost i sposobnost bioakumulacije čini ih trajnom prijetnjom za ekosustave (Gobas i sur., 2016). Pesticidi se često koriste kao modelna zagađivala u istraživanjima zbog njihove široke primjene i dokazanog utjecaja na različite ekološke razine. Kao kemikalije namijenjene kontroli štetnih organizama, pesticidi ulaze u okoliš gdje mogu uzrokovati neželjene učinke na neciljane organizme, uključujući gujavice, kukce i mikroorganizme tla (Tison i sur., 2024). Njihov utjecaj može se analizirati na razini jedinki, populacija i ekosustava, čime se omogućuje razumijevanje kako zagađivala mijenjaju strukturu i funkciju prirodnih sustava. S obzirom na njihov kompleksan utjecaj, pesticidi predstavljaju idealan model za procjenu ekotoksikoloških rizika i razvoja strategija za očuvanje ekološke ravnoteže (Beaumelle i sur., 2021; Stehle i Schulz, 2015).

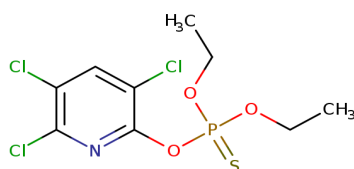
2.3.1.1. Organofosfatni pesticidi

Organofosfatni pesticidi ubrajaju se među najveće i najraznovrsnije skupine insekticida (<https://www.britannica.com/technology/insecticide#ref71060>), a njihova se široka primjena temelji na visokoj učinkovitosti u suzbijanju različitih štetnika. Od najčešće korištenih spojeva iz ove skupine ističu se paration i malation, a uz njih se često koriste i diazinon, naled, metil-paration te diklorvos. Ovi su pesticidi osobito učinkoviti protiv kukaca koji sišu biljne sokove, poput lisnih uši i grinja. Primjena organofosfata u svrhu zaštite biljaka provodi se na dva načina: prskanjem listova ili unošenjem pesticida u tlo (čime se omogućuje apsorpcija putem korijena biljaka). Zbog obično kratkog rezidualnog djelovanja, organofosfati se koriste u situacijama gdje stroge granice zaostataka pesticida (rezidualne tolerancije) određuju izbor sredstva za zaštitu bilja. Važno je napomenuti da su organofosfatni insekticidi općenito toksičniji za sisavce od kloriranih ugljikovodika. Ključni mehanizam kojim organofosfati djeluju na štetnike jest inhibicija enzima kolinesteraze, koja ima iznimno važnu ulogu u funkcioniranju živčanog sustava. Onemogućavanjem rada ovog enzima dolazi do nakupljanja neurotransmitera acetilkolina, što uzrokuje prekomjernu stimulaciju živčanih stanica, paralizira i, naposljetku, smrt kukca. Upravo zbog ovoga treba vrlo pažljivo rukovati organofosfatima te

strogo provoditi sigurnosne mjere u njihovoj primjeni. Ovi spojevi su visoko neurotoksični i za ciljane i za neciljne organizme, uključujući vodenbuhe i gujavice.

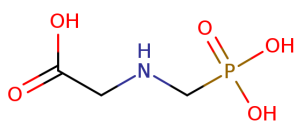
Klorpirifos (Slika 2) je organofosfatni insekticid koji djeluje prema gore opisanom mehanizmu. U izvješću FAO (2020), *D. magna* je posebno osjetljiva na klorpirifos. U pokusima akutne toksičnosti EC50 nakon 48 sati iznosi $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$, što ukazuje na izrazitu toksičnost i potrebu za ograničenjem ispuštanja klorpirifosa u vodene sustave. Ribe, poput kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), također su osjetljive na klorpirifos, s LC50 vrijednostima od $24 \mu\text{g L}^{-1}$ u istraživanjima provedenim u kontroliranim uvjetima.

Klorpirifos ima toksičan učinak na gujavice, s LC50 vrijednošću od 78 ppm u tlu. Pčele (*Apis mellifera*) su izrazito osjetljive: oralni LD50 iznosi $0,12 \mu\text{g/po}$ pčeli, a kontaktni LD50 iznosi $0,11 \mu\text{g/po}$ pčeli, što naglašava visoki rizik za oprašivače. U pokusima na štakorima LD50 iznosio je 229 mg/kg tjelesne mase, dok je inhalacijska toksičnost LC50 procijenjena na $0,385 \text{ mg L}^{-1}$. Klorpirifos uzrokuje simptome trovanja, uključujući konvulzije i otežano disanje. U ljudi je utvrđeno kako dugotrajna izloženost već pri malim dozama ($0,1 \text{ mg/kg}$ dnevno) može uzrokovati inhibiciju AChE. Klorpirifos se sporo razgrađuje u okolišu, osobito u vodi, gdje može ostati prisutan nekoliko dana do tjedana, ovisno o uvjetima. Njegova visoka lipofilnost ($\log \text{Pow} = 5,0$) sugerira sklonost bioakumulaciji. Uz to, klorpirifos se u okolišu može pretvoriti u metabolit klorpirifos-okson, koji je još toksičniji.



Slika 2. Strukturna formula kemijskog spoja klorpirifosa (izvor: Web-1)

Glifosat (Slika 3) je aktivni sastojak više od 750 različitih herbicida širokog spektra, od kojih je najpoznatiji Roundup. Djeluje inhibicijom enzima 5-enolpiruvil-šikimat-3-fosfat sintetaze (EPSPS) koji sudjeluje u biosintezi aromatičnih aminokiselina u biljnom šikimatnom putu. Ova blokada uzrokuje nedostatak ključnih proteina i smrt biljke. Budući da šikimatni put ne postoji u kralježnjaka, glifosat se često smatra sigurnim za sisavce, uključujući ljude.



Slika 3. Strukturna formula kemijskog spoja glifosata (izvor: Web-2)

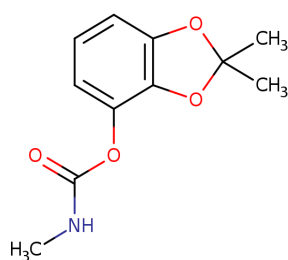
Prema Mesnage i sur. (2015), glifosat i komercijalni pripravci temeljeni na ovoj aktivnoj tvari, poput Roundupa, mogu izazvati značajne zdravstvene učinke na ljude, čak i pri razinama ispod regulatorno utvrđenih granica. Pregled dostupnih podataka ukazuje na niz potencijalnih toksičnih učinaka, uključujući hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, endokrine poremećaje i oksidacijski stres. Istraživanja na laboratorijskim životinjama pokazala su da kronična izloženost glifosatu uzrokuje oštećenja jetre i bubrega. Zabilježena je povećana aktivnost enzima poput alkalne fosfataze, alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze, što upućuje na oštećenje funkcija ovih organa. U nekim istraživanjima, doze od samo 0,09 mg/kg tjelesne mase dnevno, što odgovara okolišnim razinama, uzrokovale su promjene u biokemijskim biomarkerima krvi i funkciji enzima detoksifikacije. Također je zabilježeno da formulacije glifosata, koje sadrže adjuvanse poput POEA (polietoksilirani alkilamini), mogu pojačati toksičnost i uzrokovati promjene u staničnim membranama i mitohondrijama, što dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i oštećenja DNA. Ova oštećenja mogu izazvati staničnu smrt i pridonijeti razvoju bolesti poput raka. Glede neurotoksičnosti, iako je bilo uvriježeno kako glifosat nije neurotoksičan poput drugih organofosfata, novija istraživanja pokazuju njegov potencijal izazivanja neuroloških poremećaja, uključujući inhibiciju enzima AChE i oksidacijski stres u mozgu. Epidemiološke studije povezale su izloženost glifosatu s većim rizikom od razvoja poremećaja pažnje i hiperaktivnosti kod djece, kao i povećanim rizikom od određenih vrsta karcinoma, poput ne-Hodgkinovog limfoma. Autori ističu kako regulatorne procjene toksičnosti glifosata često ne uzimaju u obzir stvarne uvjete izloženosti i kombinirane učinke adjuvanasa u formulacijama, što može umanjiti stvarnu procjenu rizika. Studije s niskim dozama ukazuju na potrebu za revizijom sigurnosnih standarda kako bi se osigurala bolja zaštita ljudskog zdravlja.

Iako je glifosat dizajniran za uništavanje neželjenih biljaka, njegovi učinci na neciljne organizme, uključujući akvatičke vrste, izazivaju zabrinutost. Prema istraživanju Cuhra i sur. (2013), glifosat i komercijalne formulacije poput Roundupa pokazuju značajan utjecaj na vodenbuhe. Istraživanjem je dokazano kako niske koncentracije herbicida izazivaju akutne i kronične učinke koji ovise o klonskoj varijanti i dobi jedinki. U testovima akutne toksičnosti nakon 48 sati izloženosti, utvrđene EC50 vrijednosti za glifosat iznosile su od 1,4 do 7,2 mg L⁻¹, dok su za Roundup bile nešto više, u rasponu od 3,7 do 10,6 mg L⁻¹. Testovima kronične izloženosti tijekom 55 dana dokazani su značajni negativni učinci već pri koncentracijama od 0,05 mg L⁻¹ komercijalne formulacije. Pri toj koncentraciji zabilježeno je smanjenje veličine juvenilnih jedinki, dok su koncentracije od 0,45 mg L⁻¹ uzrokovale smanjenje plodnosti i

povećanje stope abortiranja jaja. Pri višim koncentracijama ($1,35 \text{ mg L}^{-1}$) gotovo 100% embrija je bilo abortirano, a izloženost koncentraciji od $4,05 \text{ mg L}^{-1}$ rezultirala je potpunom reproduktivnom neuspješnosti i smrtnosti. Studija naglašava kako razlike u toksičnosti između aktivne tvari glifosata i komercijalnih formulacija poput Roundupa proizlaze iz prisutnosti adjuvanata čija je osnovna uloga poboljšanje apsorpcije herbicida, a istovremeno povećavaju toksičnost pesticida za ne ciljane organizme. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to kako su standardne regulatorne procjene, koje često koriste visoke granične vrijednosti (npr. 930 mg L^{-1} prema EPA-i), nedovoljno reprezentativne i da zanemaruju suptilnije kronične učinke niskih koncentracija.

2.3.1.2. Karbamati

Karbamatni insekticidi, poput bendiokarba (Slika 4), slično organofosfatima, djeluju inhibicijom enzima AChE, koji razgrađuje neurotransmiter acetilkolin u sinapsama i na neuromuskularnim spojevima. Međutim, za razliku od organofosfata koji fosforilacijom nepovratno deaktiviraju enzim, karbamati uzrokuju privremenu inhibiciju kroz karbamilaciju serinske hidroksilne skupine na aktivnom mjestu enzima (Fukuto, 1990). Proces inhibicije karbamatima odvija se u dva koraka: prvo dolazi do stvaranja kompleksa enzima i inhibitora, a zatim do prijenosa karbamilne skupine na enzim, što sprječava razgradnju acetilkolina. Ova reakcija je reverzibilna, a regeneracija enzima događa se relativno brzo, s poluvremenom oporavka od oko 30 minuta, dok je kod organofosfata oporavak znatno dulji, često trajan ili višesatan.



Slika 4. Strukturna formula kemijskog spoja bendiokarba (izvor: Web-3)

Također, za razliku od organofosfata, karbamati ne zahtijevaju metaboličku aktivaciju za inhibiciju enzima, što im omogućuje brže djelovanje. Međutim, zbog reverzibilnosti, njihova inhibicija općenito traje kraće, ali su neki derivati, poput aldikarba, izrazito potentni zbog strukturalnih sličnosti s prirodnim supstratom enzima. Štoviše, neki derivati prolaze

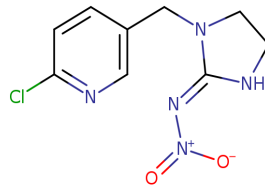
oksidacijsku aktivaciju u organizmu, što im može povećati toksičnost. Karbamati su poznati po brzom djelovanju i učinkovitosti protiv širokog spektra štetnika. Uz to, brzo se razgrađuju u okolišu, što smanjuje rizik od akumulacije u tlu i vodi, zbog čega se smatraju ekološki prihvatljivijima od nekih drugih pesticida, poput organofosfata.

U istraživanju Gupta i Sundararaman (1991) utvrđeno je kako karbamatni pesticid karbaril značajno utječe na ponašanje gujavica *Pheretima posthuma*, posebno na njihovu sposobnost ukopavanja. Istraživanje je pokazalo kako je smanjena sposobnost ukopavanja izravno povezana s inhibicijom enzima AChE gujavica. Već pri koncentraciji od 1 ppm karbarila, ukopavanje je bilo usporeno, dok su više koncentracije (4 i 8 ppm) uzrokovale potpuni gubitak sposobnosti ukopavanja i pojavu tonizirajućih tremora nakon 40 minuta izlaganja. Gupta i suradnici navode kako je mehanizam ovog učinka povezan s poremećajem prijenosa živčanih impulsa, što uzrokuje mišićnu diskoordinaciju i paralizu. Kod većine jedinki izloženih visokim koncentracijama pesticida nije došlo do oporavka, a smrt je nastupila unutar 18 sati. Nasuprot tome, jedinke izložene niskim dozama (1 ppm) pokazale su potpuni oporavak nakon 18 sati, uz normalizaciju ponašanja i sposobnosti ukopavanja. Autori ističu važnost fiziološke uloge ukopavanja u zaštiti gujavica od predatora i nepovoljnih uvjeta te naglašavaju kako čak i subletalne koncentracije pesticida mogu utjecati na njihovu funkcionalnost i doprinijeti smanjenju populacije u prirodnim staništima. Karbaril se brzo apsorbira kroz vlažnu i propusnu kožu gujavica, što povećava njihovu osjetljivost na pesticide. Ovi nalazi ukazuju na potrebu za pažljivim upravljanjem primjenom karbamatnih pesticida kako bi se smanjio negativan utjecaj na organizme od iznimne važnosti za očuvanje zdravlja tla te očuvanje biološke raznolikosti i usluga ekosustava tla.

2.3.1.3. Neonikotinoidni pesticidi

Neonikotinoidi djeluju vezanjem na nikotinske acetilkolinske receptore (nAChR) u središnjem živčanom sustavu kukaca. Njihov mehanizam djelovanja temelji se na gotovo nepovratnoj blokadi ovih receptora, što uzrokuje kontinuiranu stimulaciju živčanih impulsa i dovodi do prekomjerne živčane aktivnosti, paralize i na kraju smrti jedinke kukca (Tennekes, 2019). Imidakloprid (Slika 5) je jedan od najčešće korištenih neonikotinoidea, koji pokazuje učinke ovisne ne samo o koncentraciji, već i o trajanju izloženosti. U slučaju sporog ili nepovratnog vezanja na receptore, dolazi do kumulativnog učinka tijekom vremena, čak i pri vrlo niskim koncentracijama. Ovaj fenomen objašnjava se Druckrey-Küpfmüllerovom

jednadžbom koja sugerira da produžena izloženost može uzrokovati toksične učinke čak i ako je koncentracija vrlo niska.



Slika 5. Strukturna formula kemijskog spoja imidakloprida (izvor: Web-4)

Iako neonikotinoidi poput imidakloprida ciljaju nAChR specifične za insekte, istraživanja su pokazala kako neki organizmi, poput pčela, mogu razviti slične simptome zbog produljene izloženosti. Bayerovi znanstvenici izvorno su potvrdili nepovratno vezanje imidakloprida za receptore, no kasnija istraživanja iz Bayer CropScience-a tvrdila su kako je vezanje reverzibilno. Ipak, opažene posljedice, poput smanjenja populacija oprašivača i drugih korisnih kukaca, ukazuju na trajne štetne učinke zagađivala iz ove skupine pesticida. Neonikotinoidi se sporo razgrađuju u okolišu; imidakloprid ima poluvrijeme raspada od oko 200 dana, što povećava rizik od zagađenja tla i površinskih voda. U područjima intenzivne poljoprivrede zabilježena je visoka koncentracija ovih insekticida u vodi, što korelira s padom populacija beskralježnjaka i ptica koje se njima hrane. Ovi nalazi upućuju na to kako neonikotinoidi, unatoč selektivnosti prema ciljnim vrstama, mogu uzrokovati značajne ekološke posljedice zbog svoje toksičnosti i dugotrajne prisutnosti u okolišu.

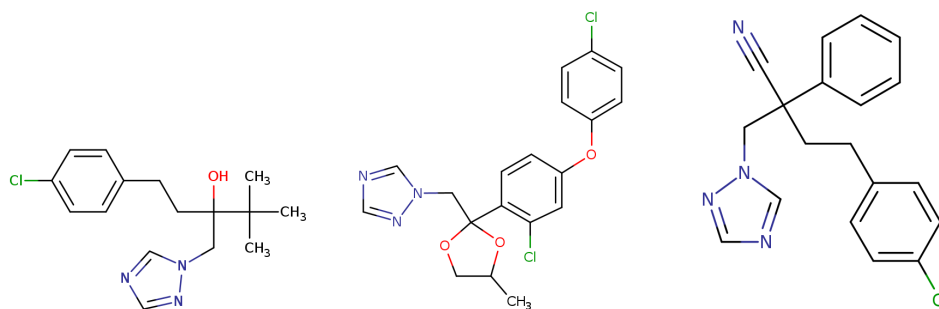
Prema istraživanju Dittbrenner i sur. (2010), imidakloprid ima značajne subletalne učinke na fiziologiju i ponašanje dviju vrsta gujavica, *Lumbricus terrestris* i *Aporrectodea caliginosa*. U istraživanju su kvantificirane promjene tjelesne mase i produkcije izmeta kao biološki pokazatelji toksičnosti tijekom sedmodnevne izloženosti različitim koncentracijama imidakloprida u tlu. Rezultati pokazuju kako imidakloprid uzrokuje značajan gubitak tjelesne mase već pri koncentracijama od 0,66 mg/kg suhog tla. Gubitak mase kod *A. caliginosa* iznosio je između 18,3% i 39%, dok su gubici za *L. terrestris* bili u rasponu od 7,4% do 32,4%. Glede produkcije izmeta, zabilježen je porast od 26,2% kod *A. caliginosa* i 28,1% kod *L. terrestris* pri najnižoj koncentraciji (0,2 mg/kg suhog tla), no pri višim koncentracijama produkcija izmeta naglo je opala, a dosegla je smanjenje od čak 96,9% kod *A. caliginosa* i 95,7% kod *L. terrestris*. Vrijednosti EC₅₀ za smanjenje produkcije izmeta iznosile su 0,76 mg/kg suhog tla za *A. caliginosa* i 0,84 mg/kg za *L. terrestris*. Ovo istraživanje pokazalo je kako relativno niske koncentracije imidakloprida, bliske predviđenim koncentracijama u

okolišu (0,33–0,66 mg/kg tla), mogu izazvati ozbiljne subletalne učinke kod gujavica. S obzirom na važnu ulogu ovih organizama u održavanju kvalitete tla i razgradnji organske tvari, navedeni rezultati sugeriraju kako bi imidakloprid mogao značajno utjecati na ekosustave tla. Autori preporučuju uvođenje testa produkcije izmeta kao standardnog biomarkera za procjenu ekotoksičnosti u budućim istraživanjima.

Prema istraživanju Jemec i sur. (2007), imidakloprid (čista aktivna tvar i komercijalni pripravak Confidor SL 200) ima značajne kronične učinke na vodenbuhe. Cilj istraživanja bio je utvrditi toksičnost insekticida imidakloprida i diazinona na reprodukciju, biokemijske parametre i preživljavanje *D. magna*. Rezultati ukazuju na veću toksičnost diazinona u pogledu reprodukcije, s vrijednostima LOEC (najniža koncentracija s opaženim učinkom) između 5 i 8 $\mu\text{g L}^{-1}$, dok su za imidakloprid i Confidor SL 200 utvrđene LOEC vrijednosti između 2,5 i 10 mg L^{-1} za reproduktivne parametre. Što se tiče preživljavanja, Confidor SL 200 je bio toksičniji od čiste aktivne tvari imidakloprida, uz LOEC od 10 mg L^{-1} u usporedbi s 40 mg L^{-1} za imidakloprid. Enzimske aktivnosti katalaze (CAT), glutation-S-transferaze (GST) i kolinesteraze (ChE) značajno su bile smanjene pri višim koncentracijama imidakloprida i Confidora SL 200, dok takve promjene nisu zabilježene kod nižih koncentracija diazinona. U radu su također izračunati omjeri rizika (eng. *risk quotients*, RQ) za okolišne koncentracije ovih insekticida. Za imidakloprid i Confidor SL 200 nisu utvrđene kronične opasnosti pri nižim koncentracijama, osim u slučaju slučajnog izlijevanja, gdje bi koncentracije mogle uzrokovati kronične i akutne učinke na vodene beskralježnjake.

2.3.1.4. Triazolni fungicidi

Tebukonazol, difenkonazol i fenbukonazol (Slika 6) su triazolni fungicidi. Triazoli pripadaju skupini fungicida koji inhibiraju demetilazu. Njihovo djelovanje temelji se na inhibiciji enzima 14- α -demetilaze, koji ima ključnu ulogu u biosintezi sterola i nužan je za sintezu ergosterola iz lanosterola u gljivama. Ergosterol, koji se nalazi u staničnim membranama gljiva i protozoa, obavlja slične funkcije kao kolesterol u staničnim membranama životinja te je stoga ključan za razvoj funkcionalnih staničnih membrana i staničnih stijenki (Price i sur., 2015). Zbog toga triazoli sprječavaju rast gljiva i naposljetku uzrokuju smrt ciljanih organizama. Ovi fungicidi se često koriste protiv pepelnice, hrđe i raznih gljivica koje uzrokuju pjegavost listova (Agrios, 2008).



Slika 6. Strukturna formula kemijskih spojeva (s lijeva na desno) tebukonazola (izvor: Web-5), difenkonazola (izvor: Web-6) i fenbukonazola (izvor: Web-7)

Prema istraživanju Sancho i sur. (2009), fungicid tebukonazol ima značajan utjecaj na energetske metabolizam i ponašanje povezano s hranjenjem *D. magna*. Cilj istraživanja bio je procijeniti promjene biokemijskih parametara, uključujući razinu glikogena, lipida, proteina i kalorijskog sadržaja, te utvrditi najosjetljiviji biomarker izloženosti. Tijekom pokusa, juvenilne vodenbuhe bile su izložene subletalnim koncentracijama tebukonazola (0,41 do 1,14 mg L⁻¹) tijekom pet dana, a analize su rađene svakih 24 sata. Rezultati su pokazali kako se energetske rezerve značajno smanjuju s povećanjem koncentracije fungicida, osobito nakon 96 do 120 sati izloženosti. Najveći pad zabilježen je u slučaju lipida, gdje je pri najvišoj koncentraciji došlo do smanjenja od 59%. Također, zabilježeno je smanjenje razine glikogena i proteina, pri čemu su se glikogen i proteini u većoj mjeri katabolizirali kako bi osigurali energiju potrebnu za preživljavanje pod stresom izazvanim fungicidom. Hranidbeni testovi pokazali su inhibiciju brzine filtracije i unosa hrane već nakon pet sati izloženosti, što je ukazalo na brzu i osjetljivu reakciju na stres izazvan zagađivačem. Autori su zaključili kako je ponašanje povezano s hranjenjem *D. magna* najosjetljiviji pokazatelj izloženosti tebukonazolu, budući kako su se promjene u unosu hrane pojavile prije nego što su bile zabilježene značajne promjene u biokemijskim parametrima. Smanjenje energetske unosa moglo bi dugoročno utjecati na rast, reprodukciju i preživljavanje populacija vodenbuha. U kasnijem istraživanju, isti istraživački tim istražio je kronične utjecaje tebukonazola na vodenbuhe - na njihovo preživljavanje, reprodukciju i rast (Sancho i sur., 2016). U istraživanju su korišteni testovi izloženosti u trajanju od 14 i 21 dana te dodatni test oporavka u kojem su jedinke, nakon 14 dana izlaganja fungicidu, bile premještene u medij bez toksikanata na razdoblje od sedam dana. Rezultati ukazuju na veliku osjetljivost reproduksijskih parametara, poput broja legla po ženki i vremena do prvog legla, na prisutnost tebukonazola. Pri koncentracijama iznad 0,52 mg L⁻¹, broj juvenilnih jedinki značajno je

opadao već nakon 14 dana, dok je nakon 21 dana broj juvenilnih jedinki po ženki pao za 93% pri najvišoj koncentraciji ($1,14 \text{ mg L}^{-1}$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Izloženost tijekom 14 dana nije utjecala na preživljavanje, ali je nakon 21 dana zabilježena smrtnost pri najvišoj koncentraciji. Rast vodenbuha, kvantificiran mjerenjem duljine tijela, također je bio inhibiran pri višim koncentracijama tijekom duže izloženosti. Unatoč sedmodnevnom periodu oporavka u mediju bez toksikanata, reproduktivni parametri se nisu vratili na kontrolne vrijednosti, što upućuje na trajne štetne učinke. S druge strane, duljina tijela se djelomično normalizirala kod svih osim kod jedinki izloženih najvišoj koncentraciji. Autori su zaključili kako je reprodukcija najosjetljiviji pokazatelj toksičnosti tebukonazola, dok produljena izloženost povećava njegov negativni utjecaj na dinamiku populacija *D. magna*.

Prema istraživanju Gao i sur. (2013), triazolni fungicidi (triadimefon, triadimenol, difenkonazol i propikonazol) imaju značajan utjecaj na biokemijske biomarkere i histološke pokazatelje gujavica *E. fetida*. Cilj istraživanja bio je procijeniti antioksidativni odgovor i promjene u tkivima nakon akutne izloženosti različitim koncentracijama fungicida. Rezultati su pokazali kako triadimenol uzrokuje značajno smanjenje ukupne razine proteina pri svim koncentracijama, dok je difenkonazol povećao razinu proteina pri nižim koncentracijama, što upućuje na obrambeni mehanizam organizama na stres. S druge strane, pri izloženosti propikonazolu utvrđen je dvofazni učinak, s početnim povećanjem razine proteina na niskim koncentracijama, ali smanjenjem pri višim koncentracijama. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze, ključnog u obrani protiv oksidacijskog stresa, smanjena je prilikom izloženosti višim koncentracijama svih triazola, što ukazuje na narušavanje antioksidativne ravnoteže. Histopatološkom analizom utvrđena su ozbiljna oštećenja tkiva pri visokim koncentracijama svih testiranih fungicida. Zabilježeni su poremećaji u strukturi epiderme, disorganizacija mišićnih vlakana te degeneracija stanica. Pri izloženosti propikonazola su utvrđene naznake apoptoze. Također je opažena nekroza i hiperemija mišićnih vlakana pri visokim koncentracijama difenkonazola i triadimefona.

2.3.2. Binarne mješavine pesticida

Procjena toksičnosti mješavina ključna je za razumijevanje kombiniranih učinaka kemijskih zagađivala u okolišu. Tradicionalna ekotoksikološka istraživanja obično se fokusiraju na pojedinačne spojeve (European Commission, 2002); međutim, organizmi u prirodnim uvjetima često su izloženi složenim mješavinama tvari. Stoga je potreba za relevantnijim i

točnijim procjenama ekološkog rizika dovela do povećanog interesa za proučavanje kombiniranih učinaka kemijskih mješavina (EFSA Scientific Committee i sur., 2019; OECD, 2018) (EFSA Scientific Committee i dr., 2019; OECD, 2018). Prema istraživanju Jager i sur., (2010), biološki utemeljen pristup procjeni toksičnosti mješavina kemikalija pruža značajne prednosti u razumijevanju učinaka na rast, reprodukciju i preživljavanje tijekom životnog ciklusa organizama. Tradicionalne metode analize toksičnosti mješavina često se oslanjaju na opisne pristupe koji ne objašnjavaju mehanizme interakcije između kemikalija. Nasuprot tome, biološki modeli, temeljeni na DEB teoriji, omogućuju procjenu načina na koji mješavine djeluju na osnovne metaboličke procese poput unosa energije, održavanja, rasta i reprodukcije. U radu je opisan model koji kombinira toksične učinke svake komponente mješavine putem jedinstvenog kinetičkog modela unosa i eliminacije. Svaka kemikalija ima svoj vlastiti profil toksičnog djelovanja. Toksični učinci interpretiraju se kao poremećaj unosa ili korištenja energetske resursa, poput povećanih troškova održavanja ili smanjene sposobnosti asimilacije hrane. Primjena ovog modela ilustrirana je pomoću podataka o učinku policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) na *D. magna*. Rezultati su pokazali kako mješavine mogu izazvati sinergističke ili antagonističke učinke, ovisno o tome djeluju li pojedinačni spojevi koji čine mješavinu na iste ili različite metaboličke procese. Modelom su uspješno objašnjeni obrasci promjena u preživljavanju, rastu i reprodukciji tijekom vremena te je naglašena važnost razmatranja fizioloških interakcija unutar organizma, koje mogu promijeniti način na koji kemikalije međusobno djeluju. Autori su zaključili kako je razdvajanje kemijskih interakcija (poput promjene bioraspodjelivosti) od fizioloških interakcija ključno za pouzdaniju procjenu rizika. Ovaj pristup pruža mogućnost ekstrapolacije rezultata na druge vrste i uvjete izloženosti te poboljšava razumijevanje toksičnosti mješavina na razini ekosustava. Autori su također naglasili potrebu za dodatnim istraživanjima kako bi se potvrdila primjenjivost ovog modela na složenije mješavine i različite medije, poput tla i sedimenta.

2.4. Metode kvantifikacije biheviorističkih elemenata

Kvantifikacija biheviorističkih elemenata sve je zastupljeniji alat u ekotoksikološkim istraživanjima budući kako promjene u ponašanju organizama često predstavljaju osjetljive biomarkere toksičnih učinaka subletalnih razina zagađivala (Bownik, 2017; Capowiez i sur., 2003). Ponašanje organizama odražava kompleksne interakcije između fizioloških,

neuroloških i okolišnih čimbenika, zbog čega se promjene u obrascima ponašanja mogu javiti prije vidljivih promjena na biokemijskoj ili fiziološkoj razini (Dell’Omo, 2002). Tradicionalne metode kvantifikacije ponašanja dugo vremena su se oslanjale isključivo na vizualna promatranja i subjektivno mišljenje stručnjaka, dok suvremeni pristupi koriste sofisticirane računalne tehnologije, uključujući strojno učenje, računalni vid i automatsku analizu podataka. Ovaj pregled obuhvaća tradicionalne i suvremene metode kvantifikacije biheviorističkih elemenata, s naglaskom na njihove prednosti i ograničenja.

2.4.1. Tradicionalne metode kvantifikacije biheviorističkih elemenata

Tradicionalne metode temelje se na vizualnom promatranju ponašanja organizama i ručnom bilježenju podataka. Ove metode najčešće uključuju osnovne metrike, kao što su brzina kretanja, učestalost promjene smjera, vrijeme nepokretnosti ili izbjegavanje kontaminiranih područja. Iako su se ove metode pokazale učinkovite u detekciji toksičnih učinaka zagađivala, njihov glavni nedostatak je podložnost subjektivnim procjenama i mogućnost ljudske pogreške.

2.4.1.1. Vizualno promatranje i ručno bilježenje podataka

U ranim istraživanjima, ponašanje organizama bilježeno je ručno. Metodologija automatizacije bilježenja ponašanja značajno je uznapredovala, osobito u akvatičkim sustavima, gdje su sofisticirani softveri za praćenje položaja jedinki omogućili detaljnu i točnu kvantifikaciju ponašanja organizama poput vodenbuha (*D. magna*) i zebrića (*Danio rerio*) (Noss i sur., 2013). Ti sustavi omogućuju praćenje parametara poput brzine plivanja, učestalosti promjena smjera i razina aktivnosti uz minimalnu intervenciju istraživača te visoku reproducibilnost podataka (Bownik, 2017). Nasuprot tome, praćenje ponašanja gujavica još uvijek se u velikoj mjeri oslanja na tradicionalne metode. Jedna od najčešće korištenih metoda je izlaganje organizama u 2D terarijima (tzv. *Evan's box*), pri čemu se putanje ručno ocrtavaju na prozirnim folijama te se digitaliziraju skeniranjem (Capowiez, 2000). Iako se ova metoda pokazala korisnom u proučavanju ekotoksikoloških učinaka (Capowiez i sur., 2003), njezin glavni nedostatak je subjektivnost i ovisnost o procjeni istraživača. Osim toga, snimanje videozapisa gujavica i ručno označavanje položaja organizma na pojedinačnim kadrovima pomoću softvera poput ImageJ (Abràmoff i sur., 2004) još uvijek predstavlja standardnu proceduru u mnogim laboratorijima (Arrázola-Vásquez i sur., 2022). Iako je ova metodologija pouzdana, zahtijeva mnogo vremena i podložna je subjektivnosti promatrača, što može utjecati na točnost rezultata.

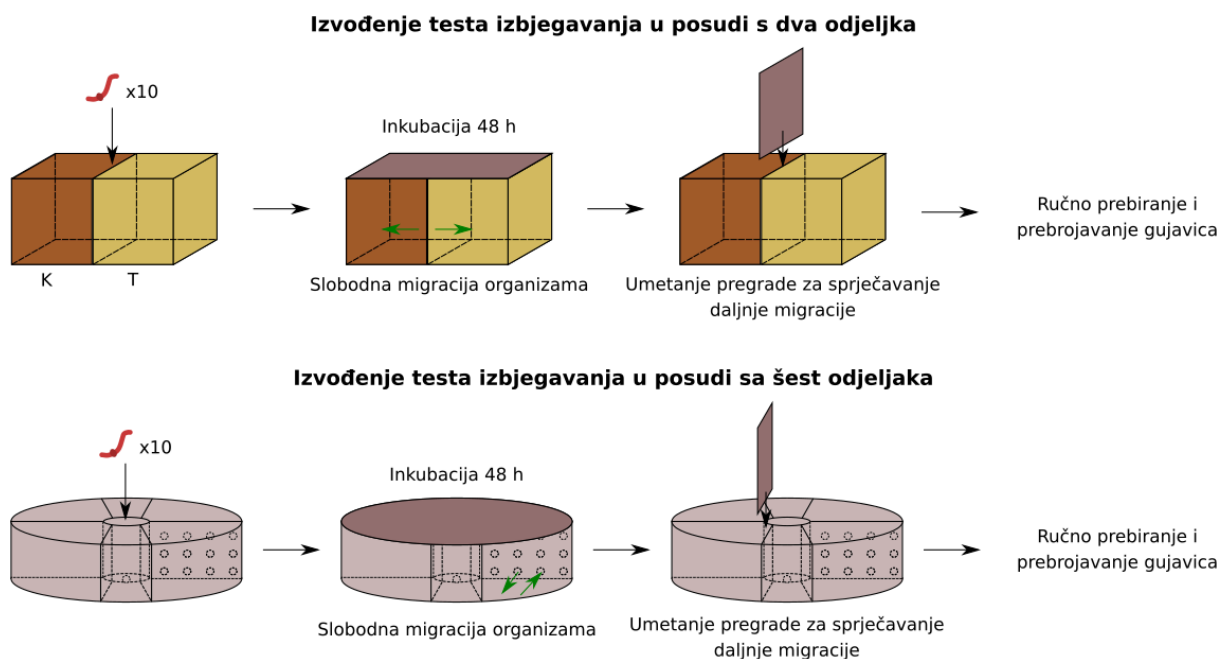
2.4.1.2. Standardizirani bihevioristički testovi

Standardizirani test imobilizacije vodenbuha, prema OECD smjernici 202 (OECD, 2004) i ISO standardu 6341 (ISO, 2012), provodi se u svrhu procjene akutnih toksičnih učinaka kemikalija. Test se temelji na izlaganju juvenilnih jedinki, mlađih od 24 sata, različitim koncentracijama ispitivane tvari tijekom razdoblja od 48 sati. Budući da je za provođenje testa potrebno osigurati da jedinke budu mlađe od 24 sata, a kako je održavanje stabilnih kultura organizama zahtjevno i za brojne laboratorije neisplativo, za provedbu testa često se koristi Daphtoxkit F (Microbiotests, Belgija) (Slika 7). Tijekom ispitivanja bilježi se broj imobiliziranih jedinki, odnosno onih koji ne mogu plivati unutar 15 sekundi nakon nježnog potresanja posude, i to nakon 24 i 48 sati izlaganja. Kako bi test bio valjan, udio imobiliziranih jedinki u kontrolnoj skupini ne smije prijeći 10%, a koncentracija otopljenog kisika u mediju mora ostati iznad 3 mg L^{-1} tijekom trajanja pokusa. Test se izvodi u staklenim posudama koje sadrže odgovarajući volumen otopine s najmanje 20 jedinki raspoređenih u nekoliko skupina po pet jedinki u svakoj jažici. Važno je osigurati da medij u kojem se provodi test ima pH između 6 i 9 te da temperatura ostane konstantna u rasponu od $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$, uz fotoperiod od 16 sati svjetla i 8 sati mraka. Rezultati testa analiziraju se kako bi se izračunala koncentracija koja uzrokuje imobilizaciju 50% jedinki (EC50) nakon 48 sati. Ako koncentracija ispitivane tvari prelazi 100 mg L^{-1} ili granicu topljivosti tvari u vodi bez značajnog učinka, provodi se tzv. granični test (eng. *limit test*) kako bi se potvrdilo da EC50 vrijednost nije niža od tog praga. Test imobilizacije *D. magna* koristi se kao ključni alat za procjenu potencijalnog ekotoksičnog rizika kemikalija za vodene ekosustave.



Slika 7. Daphtoxkit F proizvođača Microbiotests, Belgija.

Standardizirani test izbjegavanja s gujavicama, prema ISO 17512-1 smjernici (ISO, 2008), koristi se za procjenu kvalitete tla i utvrđivanje učinaka kemikalija na ponašanje organizama. Test se temelji na sposobnosti izbjegavanja zagađenih dijelova tla i preferenciji nezagađenih područja. Test izbjegavanja provodi se u posudama s dva ili šest odjeljaka (Slika 8). Gujavice se stavljaju u središnji dio testne posude i imaju slobodu kretanja između odjeljaka tijekom razdoblja od 48 sati. Na kraju testa bilježi se broj gujavica u svakom dijelu posude. Ako je više od 80% jedinki prisutno u nekontaminiranom dijelu, zagađeno tlo se smatra toksičnim jer je izazvalo jasno ponašanje izbjegavanja. Za validan test, u kontrolnim posudama, gdje oba dijela sadrže nekontaminirano tlo, raspodjela gujavica mora biti nasumična, odnosno približno 50:50. Test se provodi pri kontroliranim uvjetima, uključujući temperaturu između 18 °C i 22 °C te stalnu vlagu tla. Prije provođenja testa gujavice moraju biti u dobrom zdravstvenom stanju, s jasno definiranim klitelumom i bez znakova stresa. Ova metoda pruža uvid u funkcionalne odgovore organizama na zagađenje i koristi se kao brza i osjetljiva mjera za procjenu utjecaja kemikalija na kopnene ekosustave.



Slika 8. Shematski prikaz slijeda koraka tijekom izvođenja testa izbjegavanja u posudi s dva odjeljaka (gore) i posudi sa šest odjeljaka (dolje).

Ova metoda je brza, osjetljiva i jednostavna za izvedbu, no jedna od ključnih nedostataka je neizvjesnost tijekom trajanja testa, koji obično traje 48 sati. Naime, poznato je stanje organizama samo na početku i na kraju izlaganja, dok se promjene u ponašanju, poput brzine i dinamike migracije, tijekom tog razdoblja ne bilježe. Ovaj nedostatak ograničava mogućnost

razumijevanja kako gujavice reagiraju na zagađivala u realnom vremenu i kakvi su njihovi obrazci prilagodbe ili izbjegavanja tijekom izlaganja. Stoga je razvoj i primjena inovativnih metoda koje omogućuju kontinuirano praćenje ponašanja gujavica tijekom cijelog trajanja testa, čime bi se dobili precizniji podaci o njihovim reakcijama na prisutnost zagađivala i olakšalo tumačenje rezultata u kontekstu ekotoksikoloških procjena, od iznimne važnosti (Djerdj i sur., 2020; Rastetter i Gerhardt, 2018).

2.4.2. Suvremeni pristupi kvantifikaciji biheviorističkih elemenata

Suvremene metode za analizu ponašanja vodenbuhama i gujavicama pružaju značajne prednosti u odnosu na tradicionalne pristupe, omogućujući precizniju i automatiziranu kvantifikaciju kretanja, brzine i obrazaca ponašanja u stvarnom vremenu. Sustavi za praćenje ponašanja vodenbuhama, poput "Multi-DaphTrack" sustava (Chevalier i sur., 2014), omogućuju kontinuirano praćenje plivanja jedinki *D. magna* u više od 20 odvojenih posuda istovremeno. Ovaj sustav koristi infracrvenu tehnologiju i algoritme za analizu pokreta u svrhu detekcije promjena u brzini, smjeru i drugim parametrima kretanja. U usporedbi sa standardnim testovima imobilizacije, ovaj sustav omogućuje otkrivanje subletalnih promjena u ponašanju već nakon sat vremena izloženosti toksičnim tvarima. Langer i sur. (2021) predstavili su poluautomatski sustav za 3D analizu kretanja vodenbuha koristeći kamere bez infracrvenih filtera i algoritme razvijene u MATLAB-u. Ovaj sustav omogućuje praćenje plivanja u tri dimenzije, čime se osigurava veća preciznost i ekološka relevantnost u odnosu na dvodimenzionalne analize.

Bastardie i sur. (2005) koristili su radioaktivno označavanje za kontinuirano praćenje kretanja gujavica u umjetnim kolonama tla, omogućujući detaljnu analizu različitih vrsta kretanja poput ukopavanja i mirovanja. Ova metoda omogućila je praćenje putanja u trodimenzionalnom prostoru i otkrivanje razlika u ponašanju između vrsta gujavica te njihov utjecaj na strukturu tla. Suvremene tehnologije također su značajno unaprijedile metode praćenja gujavica. Naša istraživačka grupa razvila je sustav temeljen na dubokom učenju za kontinuirano praćenje kretanja gujavica u tlu (Djerdj i sur., 2020). Koristeći neuronske mreže za prepoznavanje dijelova tijela gujavica na slikama, sustav omogućuje precizno praćenje položaja gujavica i kvantifikaciju njihove aktivnosti u realnom vremenu. Ova metoda značajno smanjuje subjektivne pogreške i omogućuje dulje praćenje ponašanja bez prekida.

Suvremene metode ne samo da poboljšavaju osjetljivost i točnost mjerenja već i omogućuju bolje razumijevanje subletalnih učinaka zagađivala na organizme. U usporedbi s tradicionalnim metodama koje zahtijevaju ručno praćenje i analizu, suvremeni sustavi za praćenje ponašanja pružaju bržu obradu podataka, veću reproducibilnost i mogućnost automatizacije kompleksnih eksperimenata, čime se značajno unapređuje procjena ekotoksičnog rizika.

2.4.2.1. Računalni vid i automatizirana analiza

Računalni vid ima ključnu ulogu u suvremenim biheviorističkim istraživanjima, omogućujući automatizirano praćenje i analizu ponašanja modelnih organizama (Palmér, 2017). Ovaj pristup podrazumijeva primjenu algoritama za detekciju i identifikaciju jedinki na fotografijama (kadrovima videozapisa), u svrhu eliminacije potrebe za ručnim označavanjem, a posljedično i smanjenja subjektivnost istraživača. Međutim, primjenjivost metoda računalnog vida u istraživanjima razlikuje se ovisno o mediju u kojem se eksperimenti provode, što donosi određene prednosti i izazove. U slučaju rada s akvatičkim organizmima, poput vodenbuha ili zebrića, računalni vid se koristi za praćenje obrazaca plivanja, brzine kretanja, učestalosti promjena smjera i dr. (Bownik, 2017). Budući da se jedinke kreću u prozirnem mediju, tehnologijom računalnog vida relativno je lako detektirati organizme na temelju kontrasta između njihova tijela i pozadine. Dostupni su brojni komercijalni sustavi (npr. bbe Daphnia Toximeter II) i softverski paketi koji omogućuju automatizirano praćenje, kao što su Multi-DaphTrack i različiti alati razvijeni u MATLAB-u i Pythonu (Abràmoff i sur., 2004; Chevalier i sur., 2014; Häder i Erzinger, 2017). Osim toga, postoji bogata literatura koja detaljno opisuje protokole i algoritme prilagođene akvatičkim organizmima, što istraživačima olakšava prilagodbu gotovih rješenja vlastitim potrebama.

S druge strane, primjena računalnog vida u istraživanjima s gujavicama predstavlja veći izazov zbog prirode tla kao neprozirnog i heterogenog medija. Tlo stvara fizičku barijeru koja otežava praćenje gujavica, osobito tijekom ukopavanja. Razlike u boji i teksturi tla, kao i preklapanje čestica tla s tijelima gujavica, smanjuju učinkovitost tradicionalnih tehnika obrade slike poput segmentacije temeljem praga boje (Djerdj i sur., 2020). Unatoč tehnološkim naprecima, istraživanja ponašanja gujavica u prirodnom mediju, tlu, još uvijek su u fazi razvoja u usporedbi s istraživanjima akvatičkih organizama. Zbog toga se u laboratorijskim uvjetima često koriste sustavi s prozirnim podlogama (na filter papiru) kako bi se olakšalo praćenje. Primjer takvog pristupa je sustav "MimizuTrack" (Kodama i sur., 2014). Ovaj sustav

omogućuje praćenje položaja ključnih točaka tijela gujavice, uključujući glavu, rep i središnju točku tijela, u dvodimenzionalnom prostoru. Snimke se analiziraju algoritmom za obradu slike, pri čemu se organizam odvaja od pozadine na temelju boje, nakon čega se stvara skeletonska liniju tijela gujavice, koja se koristi za praćenje promjene duljine tijela i brzine kretanja. Sustav se suočava s izazovima kada se tijelo gujavice preklapa ili formira petlje, što može otežati razlikovanje glave i repa. Ipak, MimizuTrack predstavlja važan korak prema automatiziranoj analizi ponašanja gujavica, posebice u uvjetima gdje su tradicionalne metode ograničene.

Dok se za vodenbuhe već koriste poluautomatski i komercijalno dostupni sustavi s unaprijed definiranim algoritmima, za gujavice su potrebna prilagođena rješenja zbog specifičnih uvjeta tla i ponašanja tih organizama. Računalni vid u ovom kontekstu predstavlja ključan alat za unapređenje razumijevanja ekotoksičnih učinaka posebice akvatičkih organizama, pružajući istraživačima mogućnost praćenja ponašanja u realnom vremenu uz smanjenje subjektivnosti i povećanje učinkovitosti eksperimenata.

2.4.2.2. Strojno učenje i napredne analitičke tehnike

Strojno i duboko učenje revolucionirali su bihevioristička istraživanja, omogućujući automatizirano praćenje ponašanja organizama s visokom preciznošću i u velikim razmjerima (Saad Saoud i sur., 2024). Ovi pristupi koriste se za analizu obrazaca kretanja, interakcija i reakcija organizama na vanjske podražaje kroz obradu vizualnih podataka dobivenih iz videa i slika. Primjena računalnih modela temeljenih na strojnom učenju posebno je učinkovita u istraživanjima akvatičkih organizama poput vodenbuhama, ali postaje sve prisutnija i u istraživanjima ponašanja organizama tla, poput gujavica. Tehnike dubokog učenja, poput konvolucijskih neuronskih mreža i rekurentnih neuronskih mreža, primjenjuju se u analizama poput procjene položaja tijela, klasifikacije ponašanja te praćenja društvenih interakcija među jedinkama. Duboko učenje nadmašuje tradicionalne metode koje se oslanjaju na ručno promatranje i etograme, pružajući mogućnosti automatizacije i obrade velikih količina podataka u stvarnom vremenu. Ovo omogućuje otkrivanje suptilnih obrazaca ponašanja koji bi mogli proći nezamijećeno prilikom ručne analize. Jedan od ključnih doprinosa dubokog učenja je praćenje ponašanja bez upotrebe markera, što smanjuje stres za organizme i povećava preciznost analize. Alati poput DeepLabCut omogućuju visoko preciznu procjenu položaja s minimalnim potrebama za označenim podacima, dok napredniji sustavi poput BehaviorDEPOT pružaju detaljnu analizu kinematskih i posturalnih promjena. Također,

algoritmi za 3D procjenu položaja omogućuju praćenje pokreta u trodimenzionalnom prostoru, što je ključno za razumijevanje složenih oblika kretanja i interakcija u prirodnim uvjetima. Međutim, implementacija dubokog učenja u biheviorističkim istraživanjima suočava se s izazovima poput velike potrebe za označenim podacima i resursno zahtjevnim treniranjem modela. Nedostatak dobro označenih skupova podataka za različite vrste ponašanja otežava generalizaciju modela u različitim kontekstima. Kako bi se prevladali ovi problemi, istraživači koriste tehnike poput prijenosnog učenja, sintetskog generiranja podataka i polunadziranih mreža kako bi obogatili postojeće skupove podataka i smanjili zahtjeve za resursima. Primjena dubokog učenja značajno doprinosi praćenju ponašanja divljih životinja u prirodnim staništima, često u kombinaciji s dronovima, satelitima i kamerama za praćenje. Ipak, etički aspekti, poput minimalne invazivnosti i zaštite privatnosti, ključni su za održivu primjenu ovih metoda. Također, ističe se potreba za interdisciplinarnim pristupom koji uključuje računalnu znanost, ekologiju i etologiju kako bi se maksimizirali doprinosi ovih tehnologija razumijevanju ponašanja i očuvanju životinjskih populacija

Kim i sur. (2023) razvili su sustav za praćenje ponašanja *D. magna* koristeći algoritme strojnog učenja kao što su k-means klasteriranje i algoritam "simple online real-time tracking" (SORT). Njihov sustav omogućuje brzo i precizno praćenje više jedinki u realnom vremenu, nadmašujući prethodne sustave u brzini obrade podataka i točnosti identifikacije jedinki, čime se poboljšava procjena toksičnosti vode i bihevioristički odgovori na izloženost zagađivalima. U području 3D praćenja ponašanja, Yang i sur. (2021) koristili su strojno učenje za prepoznavanje obrazaca ponašanja zebrića tijekom eksperimenta s električnim podražajem. Njihov sustav temeljen na algoritmu FuzzyART omogućio je prepoznavanje suptilnih ponašanja povezanih s podražajem i analizu ponašanja u 3D prostoru, što je pokazalo značajne prednosti u preciznosti nad tradicionalnim metodama praćenja u 2D prostoru.

U istraživanjima s gujavicama, koje se kreću i ukopavaju u neprozirnom mediju, metode dubokog učenja pokazale su se iznimno korisnim za praćenje ponašanja. Djerdj i sur. (2020) razvili su model temeljen na konvolucijskoj neuronskoj mreži koji prepoznaje dijelove tijela gujavica na snimkama 2D terarija. Predikcije umjetne neuronske mreže koriste se za kvantificiranje aktivnosti organizama tijekom eksperimenata. Ova metoda omogućila je kontinuirano praćenje izbjegavanja kontaminiranog tla i pružila precizne podatke o distribuciji gujavica unutar eksperimentalne posude.

Sustavi temeljeni na dubokom učenju zahtijevaju značajne resurse za treniranje modela, uključujući velike skupove označenih podataka, ali nude visoku razinu točnosti i reproducibilnosti.

2.4.2.3. Softver za analizu biheviorističkih elemenata

Softverski alati za kvantifikaciju biheviorističkih biomarkera u ekotoksikološkim istraživanjima omogućuju automatiziranu i preciznu analizu ponašanja organizama poput vodenbuhama i gujavica. Prema pregledu Bownik (2017), ključni alati koji se koriste za praćenje plivanja vodenbuhama uključuju komercijalne programe i besplatne softverske platforme. Među najpopularnijima su Tracker®, ImageJ® i Ctrax®, koji omogućuju analizu parametara kao što su brzina, broj skokova, kutovi skretanja i ukupna udaljenost prijeđena tijekom pokusa. Sustavi poput EthoVision® posebno su dizajnirani za automatizirano praćenje ponašanja u 2D i 3D prostoru, dok DaphTox II® sustav mjeri do 14 parametara ponašanja, uključujući vertikalno kretanje, gravitaksiju i reakcije na svjetlosne podražaje. Ovi sustavi koriste infracrvenu tehnologiju za praćenje, što omogućuje promatranje ponašanja i u uvjetima niske osvijetljenosti. BehavioQuant je još jedan napredni alat za kvantitativnu analizu ponašanja akvatičkih organizama, koji koristi računalnu obradu slike za mjerenje mobilnosti i preferencije prostora unutar eksperimentalne komore.

Uz komercijalne sustave, sve više se koriste alati temeljem računalnog vida i algoritama strojnog učenja za dubinsku analizu ponašanja. Ovi pristupi omogućuju preciznu identifikaciju subletalnih promjena ponašanja koje mogu proći nezamijećeno ručnim promatranjem. Primjerice, praćenje ponašanja gujavica u tlu uz korištenje softverskih rješenja koja uključuju neuronske mreže omogućuje prepoznavanje kompleksnih obrazaca kretanja i prilagodbi na stresne uvjete. Iako su ovi sustavi resursno zahtjevni i često zahtijevaju velik broj označenih podataka za treniranje modela, njihova preciznost i reproducibilnost značajno unapređuju procjenu ekotoksičnih učinaka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalni organizmi

3.1.1. Vodenbuha vrste *Daphnia magna* Straus, 1820

Eksperimenti s vodenbuhama kao modelnim organizmima provedeni su s jedinkama vrste *D. magna* Straus, 1820 nabavljenim u obliku efipija (Slika 9) od proizvođača i službenog distributera eksperimentalnih setova za određivanje inhibicije pokretljivosti *D. magna* (Cladocera, Crustacea) (DAPHTOXKIT F magna kit).

Izlijeganje jedinki iz efipija potaknut je osiguravanjem povoljnih uvjeta temperature, intenziteta svjetlosti i sastava vodene otopine propisanih u uputama proizvođača (Microbiotests Inc., Belgija). Izlijeganje se odvijalo pri temperaturi od 20°C uz kontinuirano osvjetljenje od najmanje 6000 luxn u standardnom mediju (ISO medij, pripremljen prema ISO 6341) te uz aeraciju. Jedinke mlađe od 24 sata hranjene su spirulinom otopljenom u standardnom mediju za uzgoj 2 sata prije početka testa toksičnosti.



Slika 9. Efipije *D. magna*.

3.1.2. Gujavica vrste *Dendrobaena veneta veneta* Rosa, 1886

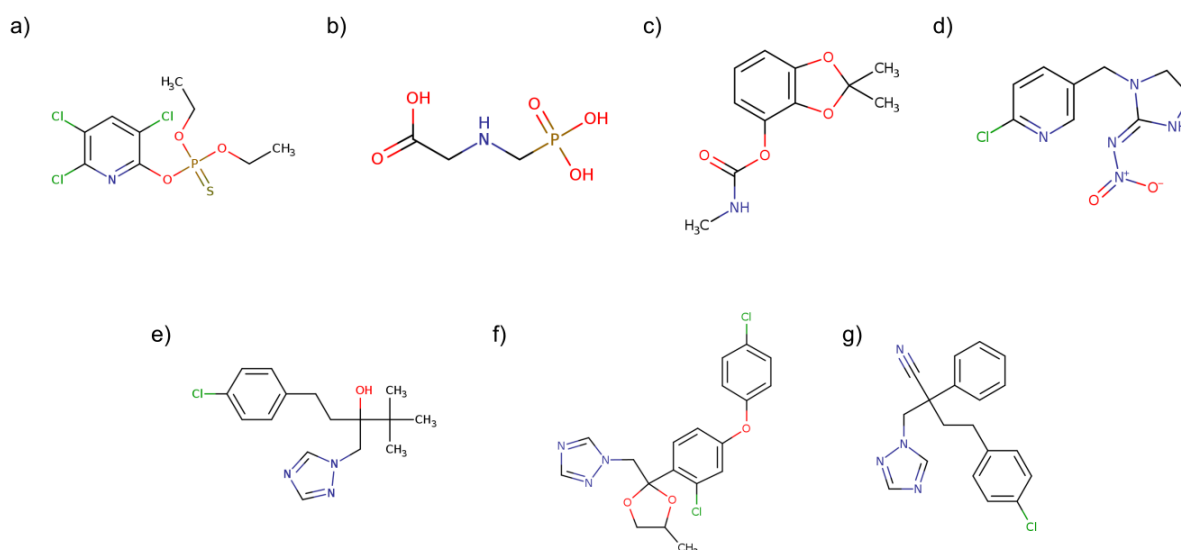
D. veneta Rosa, 1886 (Annelida: Clitellata: Lumbricidae) jedna je od najčešće korištenih vrsta kompostnih gujavica, poznata po svojoj važnoj ulozi u razgradnji organskog materijala. Ova gujavica ima dužinu tijela od 50 do 70 mm, prepoznatljivu crvenu boju s prugastom pigmentacijom i klitelum smješten na segmentima 27–33. Iako se *D. veneta* sada može pronaći širom Europe, smatra se da njezino podrijetlo potječe s područja istočnog Mediterana. Zbog svoje prilagodljivosti različitim uvjetima tla i izdržljivosti, *D. veneta* postala je modelni organizam u brojnim istraživanjima iz područja stanične biologije, imunologije, kao i istraživanjima tla i okoliša. Njezina prisutnost u tlu poboljšava strukturu i plodnost tla kroz aeraciju i ubranu razgradnju organske tvari. Zahvaljujući tim karakteristikama, *D. veneta* ima ključnu ulogu u ekosustavima i predstavlja važan alat u ekološkom istraživanju i praksi kompostiranja.

3.2. Modelni toksikanti

U ovoj doktorskoj disertaciji, korištena su zagađivala koja su široko prisutna u okolišu, s posebnim fokusom na pesticide. Pesticidi predstavljaju jedan od najvećih izvora zagađenja tla i vode u poljoprivrednim ekosustavima (Stehle i Schulz, 2015). Modelna zagađivala odabrana su s popisa aktivnih tvari iz baze podataka o pesticidima Europske unije (EU Pesticides Database), a kriteriji odabira bili su dostupnost na domaćem tržištu i prisutnost u okolišu. Formulacije pesticida korištene u eksperimentima su:

- NUFOS (Agrochem Maks), tekući emulzijski koncentrat s 480 g L⁻¹ klorpirifosa (CHP),
- Boom Efekt (Albaugh TKI d.o.o.), tekući koncentrat s 360 g L⁻¹ glifosata (GLY),
- Confidor SC 200 (Bayer Crop Science), suspenzijski koncentrat s 200 g L⁻¹ imidakloprida (IMI),
- Ficam WP80 (Bayer Crop Science), kruti insekticid s 800 g/kg bendiokarba (BDC),
- Folicur EW 250 (Bayer Crop Science), tekući emulzijski koncentrat s 250 g L⁻¹ tebukonazola (TEB),
- Difcor (Agriphar S.A.), tekući emulzijski koncentrat s 250 g L⁻¹ difenkonazola (DIF),
- Indar 5 EW (DOW Agrosiences S.A.S.), tekući emulzijski koncentrat s 50 g L⁻¹ fenbukonazola (FEN).

Strukturne formule aktivnih tvari odabranih pesticida prikazane su na Slici 10.



Slika 10. Strukturne formule spojeva a) klorpirifos, b) glifosat, c) bendiokarb, d) imidakloprid, e) tebukonazol, f) difenkonazol i g) fenbukonazol (izvori: Web 1-7)

3.3. Eksperimentalni uvjeti i dizajn eksperimenata

Svi eksperimenti u sklopu ovoga istraživanja provedeni su u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, a metodologija provedbe eksperimenata prilagođena je odabranim testnim organizmima. Eksperimenti provedeni u sklopu ovoga istraživanja temeljeni su na okolišno relevantnim koncentracijama odabranih pesticida. Svi eksperimenti uključivali su kontrolnu skupinu te su organizmi podijeljeni u eksperimentalne skupine nasumičnim odabirom. Eksperimenti su uključivali veći broj ponavljanja kontrolnih i eksperimentalnih skupina. Veličina uzorka i broj replika određeni su na temelju analize statističkih značajki vrijednosti krajnjih točaka (biheviorističkih elemenata) dostupnih u relevantnoj literaturi te u skladu sa željenom snagom (eng. *power*), razinom greške i razinom statističke značajnosti predviđenih statističkih testova te na temelju pilot istraživanja *a priori*.

3.3.1. Eksperimenti s vodenbuhama

Eksperimenti s vodenbuhama kao modelnim organizmima provedeni su s jedinkama vrste *D. magna* nabavljenim u obliku efipija (Slika 9) od proizvođača i službenog distributera eksperimentalnih setova za određivanje inhibicije pokretljivosti *D. magna* (DAPHTOXKIT F magna kit).

Kako bi se osigurala točnost testa i osjetljivost testnih organizama, proveden je kontrolni test kvalitete koristeći referentni toksični spoj kalij dikromat ($K_2Cr_2O_7$), kako je preporučeno od strane proizvođača DAPHTOXKIT F magna kit-a.

3.3.1.1. Izlaganje organizama otopinama pojedinačnih formulacija pesticida

U eksperimentima su testirane pojedinačne formulacije sedam pesticida. Otopine testnih spojeva pripravljene su u standardnom mediju za uzgoj eksperimentalnih organizama, a njihove koncentracije izražene su kao masa aktivne tvari pesticida po jedinici volumena otopine (mg A.I. / mL) (Tablica 1). Formulacije pesticida korištene u eksperimentima navedene su u potpoglavlju 3.2. Modelni toksikanti.

Tablica 1. Koncentracije pesticida izražene kao masa aktivne tvari pesticida po jedinici volumena otopine (mg A.I. / mL) korištene u eksperimentima s vodenbuhama

Pesticid	C1	C2	C3	C4	C5
Klorpirifos (CHP)	0,001 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹
Glifosat (GLY)	0,05 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹
Imidakloprid (IMI)	2,5 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	750 mg L ⁻¹
Bendiokarb (BDC)	0,5 µg L ⁻¹	1 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	25 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹
Tebukonazol (TEB)	0,001 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹
Difenkonazol (DIF)	0,001 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹
Fenbukonazol (FEN)	0,001 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹

Izlaganje je provedeno u prozirnim plastičnim Petrijevim zdjelicama promjera 50 mm, u 10 mL otopina testnih spojeva. Organizmi su izloženi otopinama zagađivala tijekom 48 sati, pri 20 °C u mraku. U pokusima je korišteno sedam replika (septaplikat), a u svakoj komori za izlaganje kontrolnoj (C0) i testnim otopinama (C1-C5) nalazilo se po pet jedinki.

3.3.1.2. Izlaganje organizama binarnim mješavinama pesticida

Eksperimenti s binarnim mješavinama provedeni su prema tzv. zrakastom dizajnu stalnih omjera (eng. *fixed-ratio ray design*) (Meadows i sur., 2002) temeljem efektnih koncentracija (EC50) pojedinačnih spojeva pesticida za srednju brzinu plivanja nakon 24-satnog izlaganja (24-h EC50(v_{av})). Rezultati EC50 vrijednosti za srednju brzinu plivanja (v_{av}) nakon 24 sata izloženosti korišteni su kao osnova za dizajn eksperimenata s binarnim mješavinama

zagađivala s obzirom kako se srednja brzina plivanja najčešće mjeri kao temeljni bihevioristički element u istraživanjima. Mješavine su pripravljene u omjerima koji odgovaraju pet omjera efekata (eng. *effect ratios*) (0%:100% (M1), 25%:75% (M2), 50%:50% (M3), 75%:25% (M4) i 100%:0% (M5)). Svaka binarna mješavina potom je razrijeđena kako bi se dobila razrjeđenja koje odgovaraju 100%, 10% i 1% volumne koncentracije svake mješavine. Eksperimenti su provedeni u pet ponavljanja (pentaplikat), pri čemu je u svaku komoru za izlaganje postavljeno po pet jedinki vodenbuha, u 10 mL otopine binarne mješavine po ponavljanju, pri 20 °C u mraku. Inkubacija je trajala 24 sata, budući kako je osnovna veličina za dizajn eksperimenta bila 24-h EC50(v_{av}). U kontrolnoj skupini nije zabilježena smrtnost niti nepokretnost organizama. Rezultati eksperimenata s binarnim mješavinama prikazani su u tabličnom obliku te pomoću izoblograma (Tallarida, 2016).

3.3.2. Eksperimenti s gujavicama

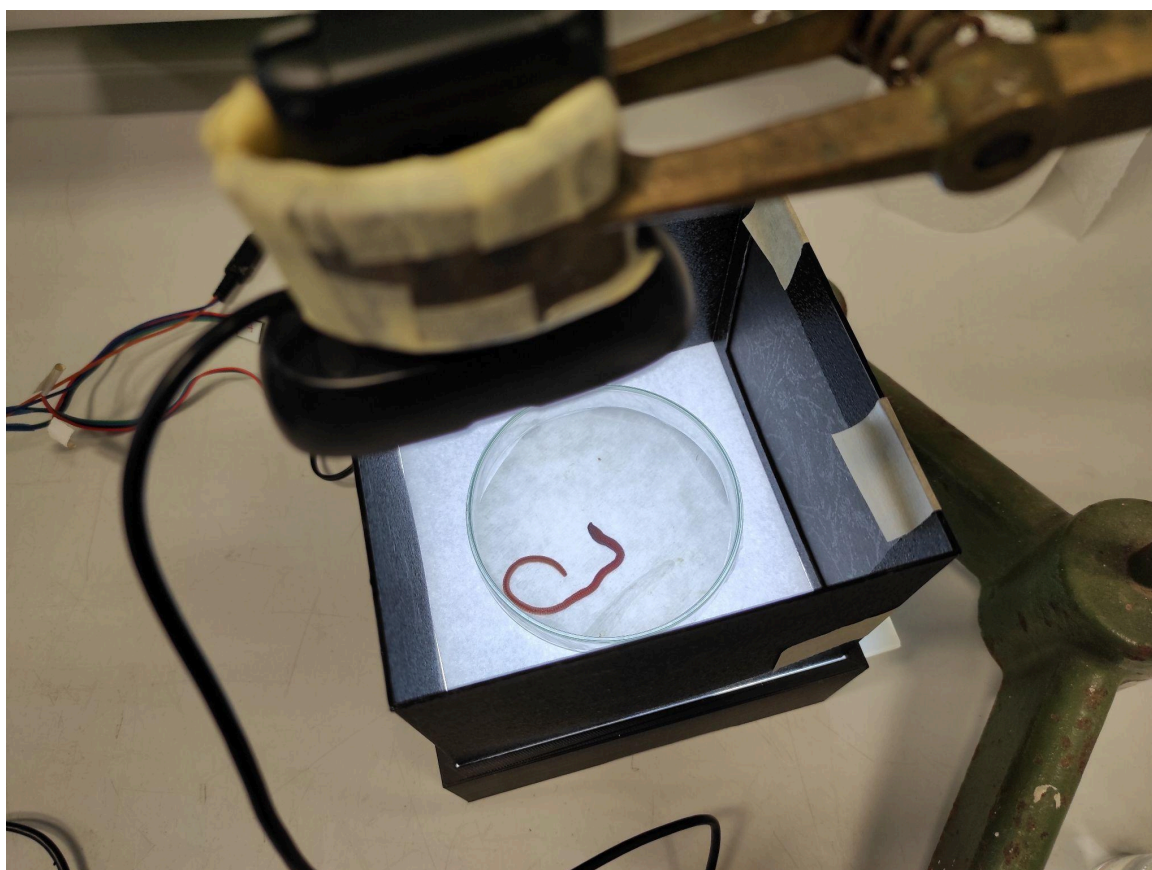
Eksperimenti s gujavicama kao modelnim organizmima provedeni su s modelnom vrstom *D. veneta*. Organizmi su izloženi odabranim pesticidima (popis pesticida dan u potpoglavlju 3.2 Modelni toksikanti) na filter papiru i u umjetnom tlu.

3.3.2.1. Izlaganje organizama na filter papiru

Ponašanje gujavica zabilježeno je u sklopu modificiranog kontakt testa na filter papiru (OECD, 1984), izlaganjem jedinki otopinama pesticida u Petrijevim zdjelicama promjera 90 mm (Slika 11). Trajanje eksperimenta bilo je 48 sati. Koncentracije testnih otopina izračunate su temeljem podataka iz literature i uputama proizvođača vezanim za primjenu proizvoda na određenoj površini zemljišta (npr. L/ha). Koncentracije pesticida izražene su kao masa aktivne tvari (eng. *active ingredient*, A.I.) pesticida po jedinici površine filter papira, u $\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$ (Tablica 2).

Tablica 2. Koncentracije pesticida izražene kao masa aktivne tvari pesticida po jedinici površine filter papira ($\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$) korištene u eksperimentima

Pesticid	C1 ($\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$)	C2 ($\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$)	C3 ($\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$)	C4 ($\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$)	C5 ($\mu\text{g A.I.} / \text{cm}^2$)
Klorpirifos (CHP)	10	25	50	100	150
Glifosat (GLY)	25	50	100	150	300
Imidakloprid (IMI)	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Bendiokarb (BDC)	2,5	5	10	25	50
Tebukonazol (TEB)	2,5	5	10	25	50
Difenkonazol (DIF)	2,5	5	10	25	50
Fenbukonazol (FEN)	25	50	100	250	500



Slika 11. Snimanje ponašanja gujavice u sklopu modificiranog filter papir testa. Na slici je prikazana kutija za jednoliko osvjetljavanje s donje strane, eksperimentalna komora (Petrijeva zdjelica čije dno je prekriveno filter papirom navlaženim testnom otopinom) u kojoj se nalazi jedinka modelnog organizma te kamera postavljena izravno iznad eksperimentalne komore.

3.3.2.2. Izlaganje organizama u umjetnom tlu

U eksperimentima je korišteno umjetno tlo sastava propisanog u odgovarajućim OECD i ISO standardima (ISO, 2023; OECD, 1984). Tretmani okolišno relevantnih koncentracija odabranih pesticida pripremljeni su homogenim umješavanjem vodenih otopina pesticida u testna tla, a koncentracije pesticida određene su temeljem podataka iz literature i/ili sukladno uputama za korištenje komercijalnih pripravaka pesticida, a koncentracije pesticida izražene su kao masa aktivne tvari pesticida po jedinici mase tla (mg A.I. / kg tla) (Tablica 3). U kontrolnoj grupi je umjesto otopina komercijalnih pripravaka pesticida u destiliranoj vodi korišten odgovarajući volumen destilirane vode. Trajanje izlaganja bilo je sedam dana.

Tablica 3. Koncentracije pesticida izražene kao masa aktivne tvari pesticida po jedinici površine filter papira (u mg A.I. / kg tla) korištene u eksperimentima

Pesticid	C1 (mg A.I. / kg tla)	C2 (mg A.I. / kg tla)	C3 (mg A.I. / kg tla)	C4 (mg A.I. / kg tla)	C5 (mg A.I. / kg tla)
Klorpirifos (CHP)	1	3	10	20	30
Glifosat (GLY)	1	5	15	30	60
Imidaklopid (IMI)	0,1	1	5	10	20
Bendiokarb (BDC)	0,1	1	5	10	20
Tebukonazol (TEB)	1	3	10	50	100
Difenkonazol (DIF)	1	3	10	50	100
Fenbukonazol (FEN)	1	3	10	50	100

3.4. Metodologija mjerenja biheviorističkih elemenata

3.4.1. Utvrđivanje i kvantifikacija biheviorističkih elemenata vodenbuha

Aktivnost plivanja vodenbuha zabilježena je 24 sata i 48 sati nakon izlaganja. Posudice za izlaganje (Petrijeve zdjelice promjera 50 mm) korištene su ujedno i kao komore za opažanje (snimanje) kako bi se eliminirao mogući učinak stresa uzrokovanog prijenosom organizama iz jedne posudice u drugu. Ponašanje vodenbuha u svakoj Petrijevoj zdjelici snimano je pomoću industrijske kamere (video rezolucije 1280×720 px) tijekom 60 sekundi pri frekvenciji (*framerate*) od 30 sličica po sekundi. Kako bi se standardizirala procedura snimanja i eliminirali učinci vanjskih podražaja na mjerene parametre, izrađena je apartura s bazom koja je služila kao izvor svjetlosti za osvjetljavanje Petrijeve zdjelice odozdo (dimenzija (D×Š×V): 14×14×6 cm), i zatvorenom komorom (dimenzija (D×Š×V): 12×12×10 cm), koja je eliminirala ambijentalno svjetlo. Vertikalno kretanje vodenbuha bilo je zanemarivo zbog plitke dubine otopine u zdjelici za opažanje. Trajektoriji *D. magna* zabilježeni su korištenjem odgovarajućih funkcija Python paketa OpenCV (Bradski, 2000) i TrackPy (Allan i sur., 2021) te novih funkcija razvijenih u okviru ovog istraživanja. OpenCV je korišten za oduzimanje pozadine, dok je otkrivanje, identifikacija i praćenje organizama obavljeno korištenjem TrackPy Python alata za praćenje čestica. Kao rezultat, dobivene su putanje pojedinih organizama. Biomarkeri ponašanja vodenbuha izračunati su pomoću NumPy (Harris i sur., 2020) iz putanja dobivenih s TrackPy paketom.

3.4.1.1. Srednja brzina plivanja tijekom promatranog razdoblja (v_m)

Ukupna udaljenost plivanja jedinki izračunata je na temelju položaja (niza x- i y-koordinata) u svakoj sličici/kadru (eng. *frame*) snimke. Udaljenost prijeđena između uzastopnih sličica izračunata je na temelju pomaka x- i y-koordinata organizma prema sljedećem izrazu:

$$d_{n \rightarrow n+1} = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2} = \sqrt{(x_{n+1} - x_n)^2 + (y_{n+1} - y_n)^2}, \text{Jednadžba 1}$$

gdje $d_{n \rightarrow n+1}$ predstavlja udaljenost prijeđenu između sličica n i $n+1$, Δx i Δy su pomaci x i y koordinata između uzastopnih sličica, a x_n , y_n , x_{n+1} i y_{n+1} su x i y koordinate organizma u dvije uzastopne sličice. Ukupna prijeđena udaljenost za svaku jedinku izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$D = \sum_{n=1}^{n=n_{frames}} d_n, \text{ Jednadžba 2}$$

gdje D označava ukupnu udaljenost koju je jedinka preplivala, a d_n predstavlja udaljenost prijedenu između uzastopnih sličica snimke. Na temelju ovih veličina, prosječna brzina plivanja izračunata je za svaku jedinku kako slijedi:

$$v_{av} = \frac{D}{t_{total}}, \text{ Jednadžba 3}$$

gdje v_{av} predstavlja prosječnu brzinu organizma tijekom cijele snimke, D je ukupna prijedena udaljenost organizma, a t_{total} je ukupno trajanje snimke u sekundama. Nakon pretvaranja prijedene udaljenosti u pikselima u milimetre, prosječna brzina plivanja svake jedinke izražena je u mm s^{-1} .

3.4.1.2. Maksimalna brzina plivanja organizama (v_{max})

Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) organizama izračunata je implementacijom jednostavnog pomičnog prosjeka (eng. *simple moving average*, SMA) duž vektora s podacima o udaljenosti prijedenoj između uzastopnih sličica, s intervalom od 15 sličica (što odgovara 0,5 sekundi). Opća jednadžba za SMA je sljedeća:

$$SMA = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i, \text{ Jednadžba 4}$$

gdje n označava širinu filtra (ovdje 15 sličica), a d_i odgovara udaljenosti prijedenoj između sličica $i+1$ i i . Tako je maksimalna brzina svakog organizma (v_{max}) izračunata kao kvocijent maksimalne vrijednosti dobivene primjenom SMA filtra i trajanja sličica ($1/\text{fps} = 1/30 \text{ s}$):

$$v_{max} = \frac{\max(SMA)}{\frac{1}{fps}}, \text{ Jednadžba 5}$$

Parametar v_{max} je izražen u mm s^{-1} .

3.4.1.3. Indeks pokretljivosti (MI) (udio vremena provedenog u kretanju)

Na temelju udaljenosti prijedene između uzastopnih sličica (izračunate prema Jednadžbi 1), algoritmom razvijenim u okviru ovog istraživanja identificirane su sličice u kojima je zabilježen pomak položaja. Iz tih podataka određen je ukupni broj sličica s pokretom, a zatim

udio vremena provedenog u kretanju. Vrijeme provedeno u kretanju određeno je za svaku jedinku, prema jednadžbi:

$$t_{swimming} = \frac{n_{frames_swimming}}{fps} = \frac{\sum d_{n \rightarrow n+1}^{>0}}{fps}, \text{ Jednadžba 6}$$

gdje $t_{swimming}$ predstavlja vrijeme provedeno u plivanju izračunato za svaku jedinku u sekundama, $n_{frames_swimming}$ je broj sličica u kojima je zabilježen pomak položaja (tj. prijeđena udaljenost je bila veća od 0), a fps je frekvencija snimanja. Konačno, udio vremena provedenog u plivanju, tj. Indeks pokretljivosti (MI), izračunat je kako slijedi:

$$MI = \frac{t_{swimming}}{t_{total}}, \text{ Jednadžba 7}$$

gdje $t_{swimming}$ predstavlja vrijeme provedeno plivajući, izraženo u sekundama (Jednadžba 6), a t_{total} označava ukupno trajanje snimke u sekundama. Moguće vrijednosti MI su u rasponu $MI \in [0, 1]$.

3.4.1.4. Prosječna frakcijska brzina (v_{frac}) (prosječna brzina tijekom perioda kretanja)

S ciljem otkrivanja potencijalnog privremenog imobilizirajućeg učinka pesticida ili učinka povećanog vremena odmora, također smo izračunali brzinu plivanja jedinki s obzirom na vrijeme provedeno plivajući. Uveli smo ovaj parametar kako bismo izračunali stvarnu prosječnu brzinu plivanja organizama te tako dobili detaljniji uvid u dinamiku njihovog kretanja. Ovaj parametar nazvan je prosječnom frakcijskom brzinom (v_{frac}) i izračunat je prema jednadžbi:

$$v_{frac} = \frac{D}{t_{swimming}}, \text{ Jednadžba 8}$$

gdje je D ukupna udaljenost koju je jedinka prešla (Jednadžba 2) (u mm), a $t_{swimming}$ je vrijeme provedeno u kretanju (u s). Parametar v_{frac} izražen je u mm s^{-1} .

3.4.1.5. Diskontinuitet kretanja (DOM)

Ukupno ponašanje vrsta roda *Daphnia* sastoji se od uzastopnih frakcija aktivnosti plivanja praćenih fazama odmora. Podaci o udaljenosti prijeđene između uzastopnih sličica snimke (Jednadžba 1) korišteni su za određivanje broja frakcija trajektorija za svaku jedinku. Niz

uzastopnih pomaka položaja smatrana je frakcijom kretanja, a ukupan broj frakcija kretanja određen za svaku jedinku korišten je kao mjera diskontinuiteta kretanja (DOM).

3.4.1.6. Prosječna duljina frakcija kretanja (MFL_{av})

Na temelju broja frakcija kretanja organizama (DOM), prosječna duljina frakcija kretanja svakog organizma izračunata je prema izrazu:

$$MFL_{av} = \frac{D}{DOM}, \text{ Jednadžba 9}$$

gdje je D ukupna prijeđena udaljenost (u mm), a DOM je broj frakcija trajektorija. MFL_{av} označava prosječnu duljinu frakcije trajektorija izraženu u mm.

3.4.1.7. Maksimalna duljina frakcija kretanja (MFL_{max})

Maksimalna duljina frakcija pokreta (MFL_{max}) određena je kao najduža udaljenost prijeđena tijekom serije uzastopnih pomaka položaja te je izražena u mm.

3.4.1.8. Broj promjena smjera (NDC)

Istodobno s izračunavanjem udaljenosti prijeđene između uzastopnih sličica, izračunat je i smjer plivanja organizama. Nagib pravca određenog dvjema točkama u odnosu na x-os može se izračunati kao:

$$\tan\theta = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{(y_{n+1} - y_n)}{(x_{n+1} - x_n)}, \text{ Jednadžba 10}$$

gdje $\tan\theta$ predstavlja tangentu smjera plivanja organizma, Δx i Δy su pomaci x i y koordinata između uzastopnih sličica, a x_n, y_n, x_{n+1} i y_{n+1} su x i y koordinate organizma u dvije uzastopne sličice. Posljedično, smjer plivanja organizma (kut u odnosu na x-os), definiran x i y koordinatama organizma u uzastopnim sličicama, izračunava se kao:

$$\theta = \tan^{-1} \frac{\Delta y}{\Delta x} = \tan^{-1} \frac{(y_{n+1} - y_n)}{(x_{n+1} - x_n)}, \text{ Jednadžba 11}$$

gdje je \tan^{-1} trigonometrijska inverzna tangens funkcija, a ostali simboli su identični onima opisanim za Jednadžbu 10. Kut θ u Jednadžbi 11 izračunat u radijanima zatim se pretvara u stupnjeve:

$$\theta_{deg} = \theta_{rad} \cdot \frac{180}{\pi}, \text{ Jednadžba 12}$$

Nakon izračunavanja smjera plivanja svakog organizma između uzastopnih sličica, promjena smjera mogla je biti otkrivena usporedbom uzastopnih smjerova plivanja primjenom pravila:

$$\begin{aligned} &IF |\theta_{n+1} - \theta_n| \geq thrs: DC = 1 \\ &ELSEIF |\theta_{n+1} - \theta_n| < thrs: DC = 0 \end{aligned} \text{Jednadžba 13}$$

što znači da je promjena smjera (DC) otkrivena ako smjer plivanja organizma u sličici $n+1$ (θ_{n+1}) odstupa za $\pm thrs$ u odnosu na smjer izračunat za sličicu (θ_n). Prag vrijednosti ($thrs$) korišten u izračunima bio je 10° , čime se izbjegavala “lažno pozitivna” očitavanja zbog određivanja središnje koordinate organizama. Konačno, ukupni broj promjena smjera (NDC) svakog organizma izračunat je kao zbroj otkrivenih promjena smjera:

$$NDC = \sum DC. \text{Jednadžba 14}$$

3.4.1.9. Indeks promjene smjera nakon odmora (AR_DCI)

Za izračunavanje ovog parametra, uspoređen je smjer plivanja organizama prije i nakon pojedine faze odmora. Koristeći te podatke, određen je broj slučajeva kada su organizmi promijenili smjer plivanja nakon faze odmora u odnosu na smjer prije faze odmora. Također, utvrđen je broj slučajeva kada su organizmi zadržali smjer plivanja nakon faze odmora. Indeks promjene smjera nakon odmora izračunat je prema izrazu:

$$AR_DCI = \frac{AR_N_{DC}}{AR_N_{DC} + AR_N_{DS}}, \text{Jednadžba 15}$$

gdje je AR_DCI indeks promjene smjera nakon odmora, AR_NDC je broj slučajeva kada su organizmi promijenili smjer plivanja nakon faze odmora, a AR_NDS je broj slučajeva kada su organizmi zadržali smjer plivanja nakon faze odmora. Moguće vrijednosti AR_DCI su u rasponu $AR_DCI \in [0, 1]$.

3.4.1.10. Fraktalna dimenzija (FD)

Fraktalna dimenzija putanja plivanja vodenbuha izračunata je korištenjem formule Katza i Georgera (1985):

$$FD = \frac{\log(N)}{\log(N) + \log\left(\frac{D}{L}\right)}, \text{Jednadžba 16}$$

gdje je L ukupna duljina trajektorija jedinke (izračunata prema Jednadžbi 2), D je promjer opsega trajektorija (maksimalna udaljenost između bilo koje dvije točke putanje), a N je broj koordinata koji čine trajektorij, tj. ukupan broj kadrova snimke (izračunato kao umnožak trajanja snimke (u sekundama) i frekvencije snimanja (fps)).

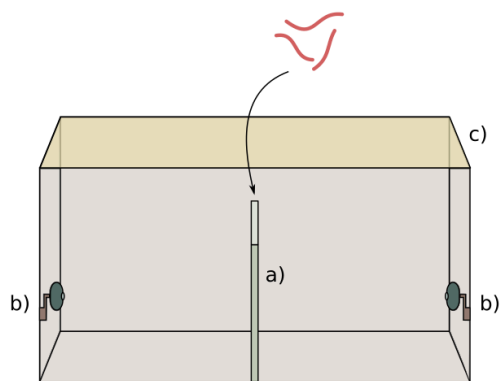
3.4.2. Utvrđivanje i kvantifikacija biheviorističkih elemenata gujavica

3.4.2.1. Određivanje biheviorističkih elemenata gujavica u okviru modificiranog filter papir testa

U okviru modificiranog filter papir testa, ponašanje gujavica praćeno je snimanjem u 24-satnim vremenskim razmacima. Dobiveni videozapisi korišteni su kao ulazni podaci za algoritam za segmentaciju gujavica, s ciljem određivanja skupa piksela koji pripadaju gujavici i njihove izolacije od pozadinskog okruženja. Nakon uspješne segmentacije primijenjena je tehnika skeletonizacije kako bi se struktura gujavice pojednostavila na tzv. osnovni skelet, odnosno centralnu liniju koja najbolje predstavlja glavni oblik tijela. Na temelju izvornih i skeletoniziranih slika izvršena je detekcija prostomija, čime je identificiran prednji dio tijela gujavice, te je određen smjer njenog kretanja. Analiza ovih elemenata omogućila je kvantifikaciju biheviorističkih parametara gujavica tijekom eksperimentalnog razdoblja te izračunavanje prosječne brzine kretanja, njezinog relativnog položaja u odnosu na površinu Petrijeve zdjelice (uz rub ili prema središnjem dijelu), udio vremena provedenog krećući se prema naprijed i unatrag, indeks pokretljivosti (MI) te broj podizanja prostomija.

3.4.2.2. Određivanje biheviorističkih elemenata gujavica u okviru modificiranog testa u tlu

Za kontinuirano praćenje ponašanja gujavica izravno u tlu korištena je aparatura i softversko rješenje koje smo sami razvili (Djerdj i sur., 2020). Aparatura se sastoji od zatvorene drvene kutije (75 cm x 30 cm x 35 cm), 2D terarija sastavljenog od dvije staklene ploče (25 cm x 20 cm) međusobno odmaknute 4 cm, te dvije web-kamere postavljene simetrično na obje strane terarija (Slika 12). 2D terarij ispunjen je rahlim umjetnim tlom sastava propisanog protokolima OECD i ISO (ISO, 2023; OECD, 1984) relativne vlažnosti 50%.



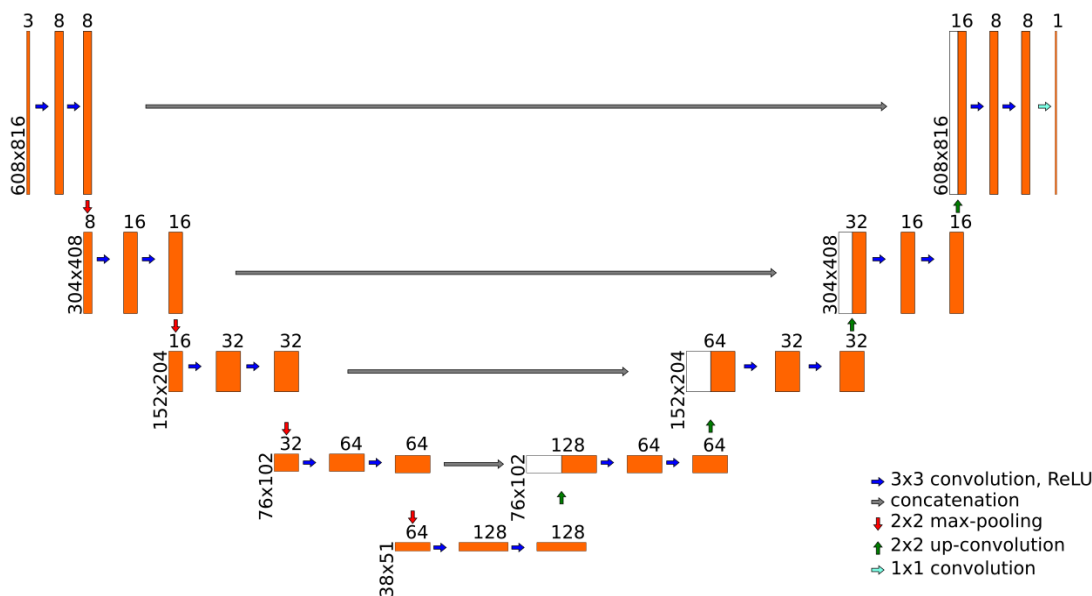
Slika 12. Shematski prikaz aparature za kontinuirano praćenje ponašanja gujavica u tlu: a) 2D terarij, b) kamere, c) kutija s poklopcem koji sprječava prodiranje ambijentalne svjetlosti.

Položaj gujavica tijekom trajanja eksperimenata bilježen je istovremenim fotografiranjem obje strane terarija pomoću web-kamera centriranih i postavljenih na jednaku udaljenost od terarija (Slika 13). Za vrijeme aktivacije kamera svjetlo se automatski na kratko (~ 1 s) upalilo. Web-kamere su se aktivirale svakih 60 s. Fotografije obje strane terarija bilježene i pohranjene su pomoću OpenCV paketa (Bradski, 2000) u Python programskom jeziku. S ciljem postizanja međusobnog preklapanja slika dobivenih s web kamera, prethodno je izvršena kalibracija kamera. Prije analize slijeda fotografija položaja gujavica, na fotografijama je pomoću funkcija iz paketa OpenCV izvršena i korekcija perspektive.



Slika 13. Primjer fotografije jedne stranice 2D terarija u kojem se nalazi gujavica.

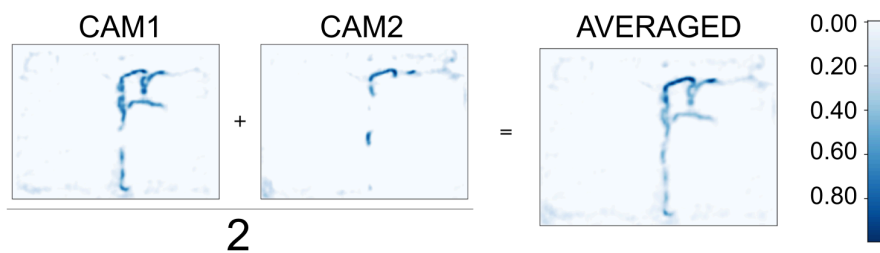
Određivanje položaja gujavica ukopanih u tlo postignuto je korištenjem duboke konvolucijske neuronske mreže (Slika 14) (Long i sur., 2015) simetrične (tzv. U-net) arhitekture građene od silaznog (sužavajućeg) i uzlaznog (proširujućeg) kraka (Ronneberger i sur., 2015).



Slika 14. Struktura "U-net" duboke neuronske mreže. Narančasti pravokutnici označavaju višekanalne mape značajki (eng. *multi-channel feature maps*). Broj kanala u svakom od njih označen je brojem iznad pravokutnika, dok je prostorna dimenzija (x-y) naznačena u donjem lijevom dijelu pravokutnika. Bijeli pravokutnici označavaju kopirane mape značajki. Plavim strelicama označene su operacije 3x3 konvolucije nakon koje slijedi ReLU aktivacijska funkcija. Sive strelice označavaju operaciju spajanja mapa značajki. Crvenim strelicama označeni su slojevi koji vrše sažimanje (eng. *pooling*). Zelene strelice označavaju 2x2 dekonvolucijske slojeve. Svjetloplava strelica označava operaciju 1x1 konvolucije.

Ulazni podatak (dimenzija 816 px x 608 px x 3) skaliran na raspon vrijednosti 0-1 najprije ulazi u sužavajući krak kojeg čini veći broj blokova od po dvije uzastopne operacije 3x3 konvolucije, nakon čega slijedi ReLU (eng. *rectifier linear unit*) aktivacijska funkcija te 2x2 sažimanje maksimalnom vrijednošću (eng. *max pooling*) s korakom od 2. Prolaskom kroz slojeve silaznog kraka, broj kanala značajki u svakom koraku se udvostručuje, od 8 do 128. Uzlazni krak čine blokovi od uzastopne operacije 2x2 dekonvolucije (transponirana konvolucija), operacije spajanja odgovarajućih mapa značajki iz silaznog i uzlaznog kraka i dvije uzastopne operacije 3x3 konvolucije. Posljednji sloj neuronske mreže je operacija 1x1 konvolucije nakon kojeg slijedi aktivacijska funkcija softmax. Sve operacije konvolucije koriste nepromijenjeno nadopunjavanje (eng. *same padding*), što znači da mapu značajki nadopunjuju nulama oko rubova na način da, nakon konvolucije, izlazna mapa značajki ima očuvane dimenzije. Izlazni podatak neuronske mreže je 1D matrica jednakih prostornih dimenzija kao ulazni podatak koja za svaki piksel ulaznog podatka daje vrijednost vjerojatnosti da taj piksel pripada gujavici. Kada se ovaj postupak ponovio za sve slike

pohranjene tijekom trajanja eksperimenta s obje kamere, položaj organizama na području terarija bilo je moguće pratiti i tijekom vremena. No, budući da su kamere postavljene na suprotne strane terarija, preklapanje i komplementarnost istovremeno načinjenih fotografija postignuto je horizontalnim okretanjem svih slika dobivenih s jedne od kamera. Potom, kako bi se dobio uvid u trenutno stanje i položaj eksperimentalnih organizama, izračunat je prosjek predikcija modela za odgovarajuće parove slika s dvije kamere (Slika 15). Konačni rezultat se nakon toga podvrgnuo filtriranju vrijednosti nižih od zadane granične vrijednosti (eng. *thresholding*). Time je postignuto smanjenje šuma u konačnom rezultatu.



Slika 15. Primjer izračuna prosječne vrijednosti predikcije (AVERAGED) modela za par slika dobiven istovremenom aktivacijom kamera postavljenih na suprotne strane terarija (CAM1 i CAM2).

3.5. Primjena dubokog učenja u svrhu detekcije izloženosti organizama zagađivalima

U svrhu detekcije izloženosti vodenbuha različitim zagađivalima primijenjen je algoritam dubokog učenja zasnovan na višeslojnoj neuronskoj mreži (eng. *multi-layer perceptron*, MLP). Korišteni skup podataka uključivao je deset biheviorističkih elemenata povezanih s kretanjem vodenbuha (v_{av} , v_{frac} , DOM , MFL_{av} , MI , NDC , v_{max} , MFL_{max} , AR_DCI , FD) i vrijeme izloženosti, koji su korišteni kao ulazne vrijednosti MLP. Pripadajuće oznake tretmana, definirane kao kombinacija oznaka pesticida i eksperimentalne grupe, korištene su kao izlazne vrijednosti MLP-a za klasifikaciju. Standardizacija ulaznih varijabli je provedena tako da su sve vrijednosti prilagođene na način da imaju srednju vrijednost nula i standardnu devijaciju jedan prema slijedećem izrazu:

$$z = \frac{x-\mu}{\sigma}, \text{ Jednadžba 17}$$

gdje je x pojedinačna vrijednost varijable, μ je srednja vrijednost varijable i σ standardna devijacija varijable, a z je standardizirana vrijednost. Svrha ovog koraka je ujednačavanje varijanci ulaznih varijabli kako bi se spriječila dominacija varijabli s većim rasponom vrijednosti nad modelom i osigurala stabilnija konvergencija tijekom treniranja mreže.

Ciljna varijabla definirana je kao kombinacija tretmana i koncentracijske grupe za svaki eksperimentalni uzorak te je kodirana pomoću *one-hot* metode. *One-hot* kodiranje je tehnika koja se koristi za pretvaranje kategorijskih podataka u numerički oblik. Svaka kategorija iz izvorne varijable pretvara se u jedinstveni binarni vektor, gdje svaki vektor ima duljinu jednaku ukupnom broju kategorija. U ovom vektoru, pozicija koja predstavlja određenu kategoriju ima vrijednost 1, dok su sve ostale vrijednosti 0.

Na primjer, u slučaju kada je riječ o tri kategorije (npr. A, B i C), *one-hot* kodiranjem klasa A poprima oblik [1, 0, 0], klasa B [0, 1, 0], a klasa C [0, 0, 1]. Ova tehnika omogućava razlikovanje kategorija bez uvođenja numeričkog rangiranja među njima.

Skup podataka je podijeljen u skup za treniranje i testiranje primjenom stratificirane podjele kako bi se očuvala reprezentativnost klasa u oba skupa, odnosno zastupljenost populacijskih podgrupa u uzorku. Model neuronske mreže sastavljen je od tri sloja: ulaznog sloja prilagođenog broju značajki (11 neurona), dvaju skrivenih slojeva sa po 64 neurona, te

izlaznog sloja s brojem neurona koji odgovara broju jedinstvenih klasa (35 neurona). Kao aktivacijska funkcija skrivenih slojeva korištena je ReLU (eng. *rectified linear unit*):

$$ReLU(x) = x^+ = \max(0, x) = \frac{x+|x|}{2}, \text{ Jednadžba 18}$$

pri čemu funkcija $ReLU(x)$ vraća vrijednost x kada je $x > 0$, a 0 kada je $x \leq 0$.

U izlaznom sloju primijenjena je funkcija *softmax* (Jednadžba 19). *Softmax* funkcija, poznata i kao *softargmax* ili normalizirana eksponencijalna funkcija, pretvara vektor od K realnih brojeva u distribuciju vjerojatnosti za K mogućih ishoda. Ona predstavlja generalizaciju logističke funkcije na više dimenzija te se koristi u multinomijalnoj logističkoj regresiji. *Softmax* funkcija često se koristi kao završna aktivacijska funkcija neuronske mreže kako bi normalizirala izlaz mreže u distribuciju vjerojatnosti nad predviđenim klasama izlaza.

$$\sigma(z)_i = \frac{e^{z_i}}{\sum_{j=1}^K e^{z_j}}, \text{ Jednadžba 19}$$

gdje je z ulazni vektor, e^{z_i} je standardna eksponencijalna funkcija za ulazni vektor, K je broj klasa u višeklasnom klasifikatoru, a e^{z_j} je standardna eksponencijalna funkcija za izlazni vektor.

Prilikom treninga modela kao funkcija gubitka (eng. *loss function*) korištena je kategorijska unakrsna entropija (eng. *categorical cross-entropy*), primjenom algoritma za optimizaciju Adam (Kingma i sur., 2014), sa stopom učenja 0,001.

U svrhu optimizacije modela, korištena je tehnika iterativnog treniranja kroz 50 iteracija s različitim slučajnim početnim stanjima. U svakoj iteraciji model je evaluiran i pohranjena je inačica s najboljim performansama. Evaluacija modela obuhvatila je izračun konfuzijskih matrica za svaku iteraciju. Nakon svih iteracija, izrađena je srednja konfuzijska matrica kao agregirani prikaz klasifikacijske točnosti modela u 50 iteracija, a dodatno je prikazana i kumulativna matrica pogrešaka. Ovi rezultati prikazani su primjenom toplinskih mapa (eng. *heatmap*), uz pripadajuće oznake stvarnih i predviđenih klasa. Za analizu stabilnosti mreže, broj ostvarenih epoha po iteraciji te najbolja točnost treniranja modela u svakoj iteraciji pohranjeni su u CSV datoteku za daljnje usporedbe i evaluaciju.

3.6. Statistička obrada podataka

Svi podaci analizirani i vizualizirani su u programskom okruženju R, verziji 4.4.1 (R Core Team, 2024). Budući da su statistički značajna odstupanja od normalnosti utvrđena korištenjem Shapiro-Wilk testa, razlike između tretiranih i kontrolnih skupina analizirane su Kruskal-Wallisovom jednosmjernom analizom varijance, nakon čega je proveden Dunnov *post-hoc* test (razina značajnosti = 0,05). Prilagodba krivulja ovisnosti o dozi i izračun koncentracija učinka (EC_x) provedeni su korištenjem paketa drc (Ritz i sur., 2015). S ciljem određivanja najprikladnijeg modela, na podatke su primijenjene slijedeće funkcije:

3-parametarska log-logistička funkcija s donjom asimptomom 0:

$$f(x) = 0 + \frac{d-0}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))} , \text{Jednadžba 20}$$

gdje je b parametar nagiba, d je gornja asimptota, a parametar e odgovara ED50.

3-parametarska Weibull funkcija (tip 1) s donjom asimptomom 0

$$f(x) = 0 + (d - 0) \exp(- \exp(b(\log(x) - e))) , \text{Jednadžba 21}$$

gdje je b parametar nagiba, d je gornja asimptota, a $\exp(e)$ je točka infleksije.

3-parametarska Weibull funkcija (tip 2) s donjom asimptomom 0

$$f(x) = 0 + (d - 0) \exp(- \exp(b(\log(x) - \log(e)))) , \text{Jednadžba 22}$$

gdje je b parametar nagiba, d je gornja asimptota, a $\exp(e)$ je točka infleksije.

Brain-Cousens hormetički model s donjom asimptomom 0

$$f(x) = 0 + \frac{d-0+fx}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))} , \text{Jednadžba 23}$$

gdje parametar b nema izravnu interpretaciju, d je gornja asimptota, parametar e nema izravnu interpretaciju, a parametar f je proporcionalan jačini hormetičkog učinka ($f=0$ označava izostanak hormetičkog učinka; ovaj parametar mora biti pozitivan kako bi model bio valjan, tj. $f > 0$).

3-parametarska asimptotska regresija s donjom asimptomom 0

$$f(x) = c + (d - c)(1 - \exp(-\frac{x}{e})) , \text{Jednadžba 24}$$

gdje je c donja asimptota (u $x=0$), parametar d je gornja asimptota, dok je parametar $e > 0$ odgovoran za strminu porasta funkcije u ovisnosti o x .

3-parametarski pomaknuti Michaelis-Menten model

$$f(x) = c + \frac{d-c}{1+e/x} , \text{Jednadžba 25}$$

gdje je c donja asimptota (u $x=0$), a d gornja asimptota. Parametar e odgovara dozi koja daje odgovor na pola puta između c i d .

Odabir modela tijekom prilagodbe ovisnosti o dozi temeljen je na testu prikladnosti i Akaikeovom informacijskom kriteriju (AIC). Na temelju rangiranja modela, odlučeno je primijeniti troparametarske log-logističke funkcije (LL.3) na sve podatke. Na podatke su primijenjene log-logističke funkcije s tri parametra i donjom asimptotom fiksiranom na 0, korištenjem funkcije "LL.3", dok je prisutnost hormetičkih odgovora procijenjena prilagodbom log-logističkog modela Brain-Cousens s pet parametara, korištenjem funkcije "BC.5". Parametri modela ovisnosti o dozi uspoređeni su funkcijom "compParm" (razina značajnosti = 0,05). Koncentracije pri kojima nije opažen učinak (NOEC) određene su funkcijom "NOEC" iz paketa mixtox (Zhu, 2022).

Interakcije komponenti binarnih ekvivotoksičnih mješavina (aditivnost, sinergizam ili antagonizam) procijenjene su na temelju izobolografskog pristupa korištenjem funkcije "isobole" paketa drc (Ritz i sur., 2015). Dizajn i interpretacija rezultata eksperimenata s binarnim mješavinama temeljeni su na konceptu toksične jedinice (eng. *toxic unit*, TU) (Warne, 2003). Toksična jedinica (TU) ovdje predstavlja koncentraciju pesticida koja uzrokuje smanjenje prosječne brzine plivanja organizama za 50% nakon 24 sata izloženosti (EC50). U slučaju mješavina, primjerice, 1 TU sadrži 0,5 TU TEB (1/2 EC50) i 0,5 TU DIF (1/2 EC50). Linija aditivnosti koja povezuje parove doza koje uzrokuju EC50 efekt dodana je izoboligramima kako bi se omogućila vizualna razlika između aditivnih, sinergističkih i antagonističkih interakcija. Stupanj interakcije pesticida kvantificiran je indeksom kombinacije (eng. *Combination Index*, CI), izračunatim za svaki omjer miješanja (Zhao i sur., 2010), pri čemu $CI = 1$ označava aditivni učinak, $CI < 1$ sinergistički učinak, a $CI > 1$ antagonistički učinak. CI su izračunati korištenjem funkcije "CIcomp" paketa drc u R-u (Ritz i sur., 2015). Parametri modela, uključujući vrijednosti efektivne doze (ED) i njihove

standardne pogreške su procijenjeni te su također određeni intervali povjerenja za CI. p-vrijednost (CA_{diff}p) također je izračunata kako bi se testiralo je li CI značajno različit od 1, što ukazuje na potencijalne sinergističke ili antagonističke interakcije (Martin-Betancor i sur., 2015).

4. REZULTATI

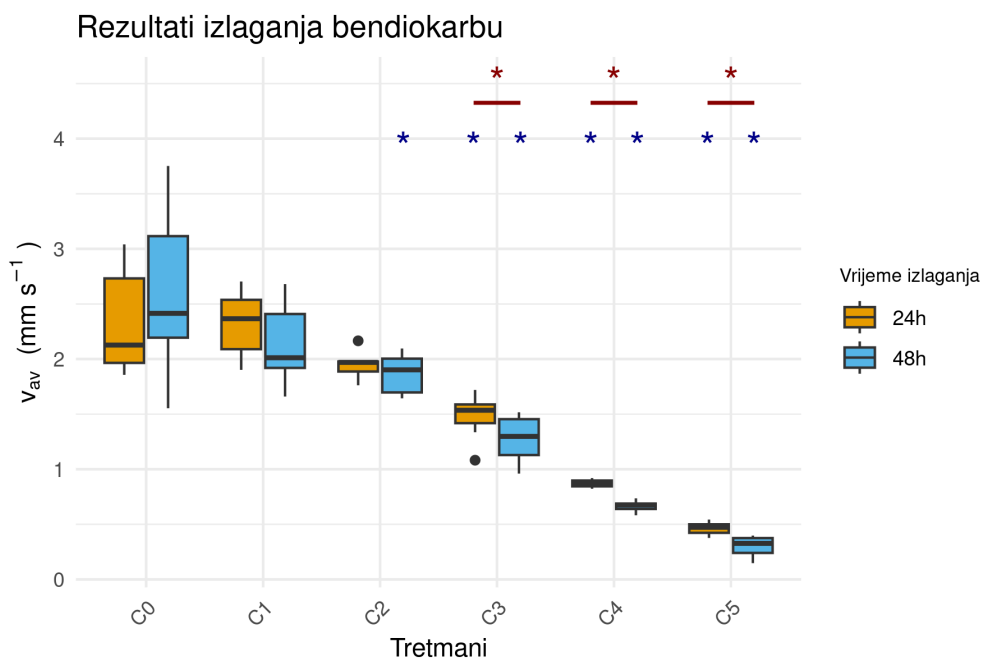
4.1. Učinak zagađivala na biheviorističke elemente vodenbuha (*D. magna* Straus, 1820)

4.1.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na biheviorističke elemente vodenbuha

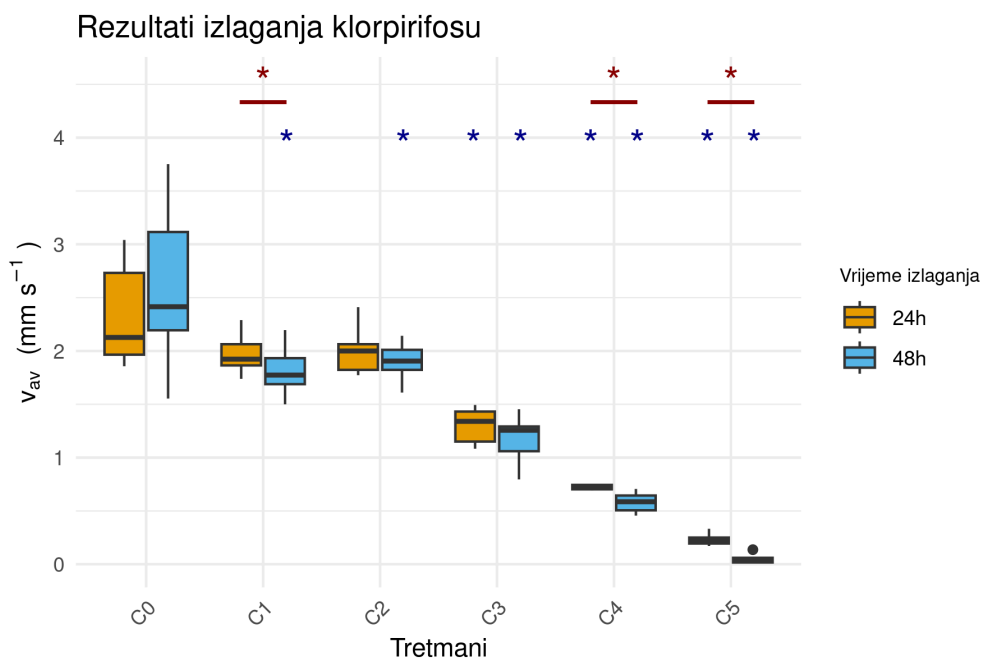
4.1.1.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na srednju brzinu plivanja tijekom promatranog razdoblja (v_{av})

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 16). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C3, C4 i C5 BDC.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 17). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod svih koncentracija CHP (C1-C5). Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C4 i C5 CHP.

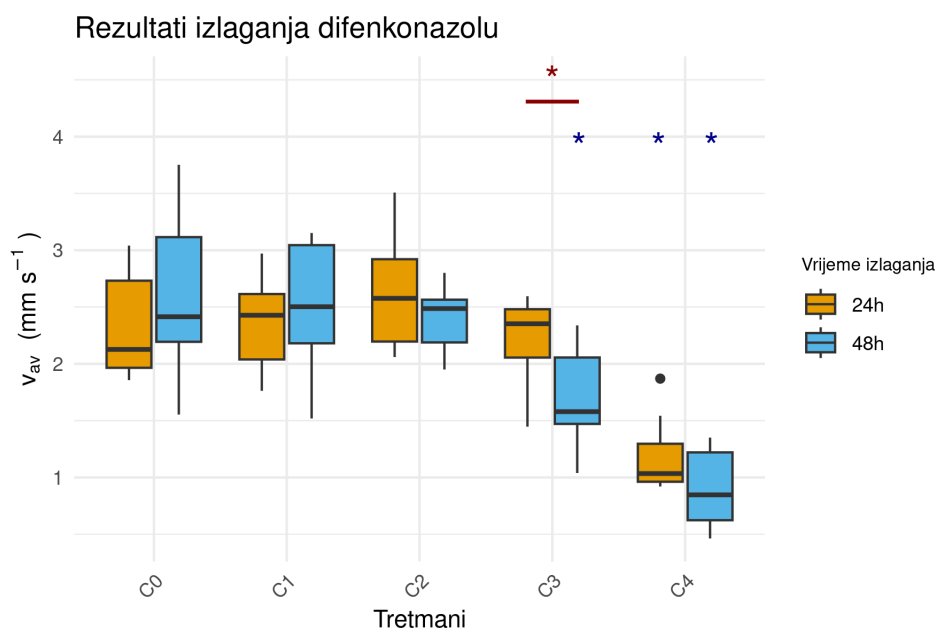


Slika 16. Utjecaj bendiokarba (BDC) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.



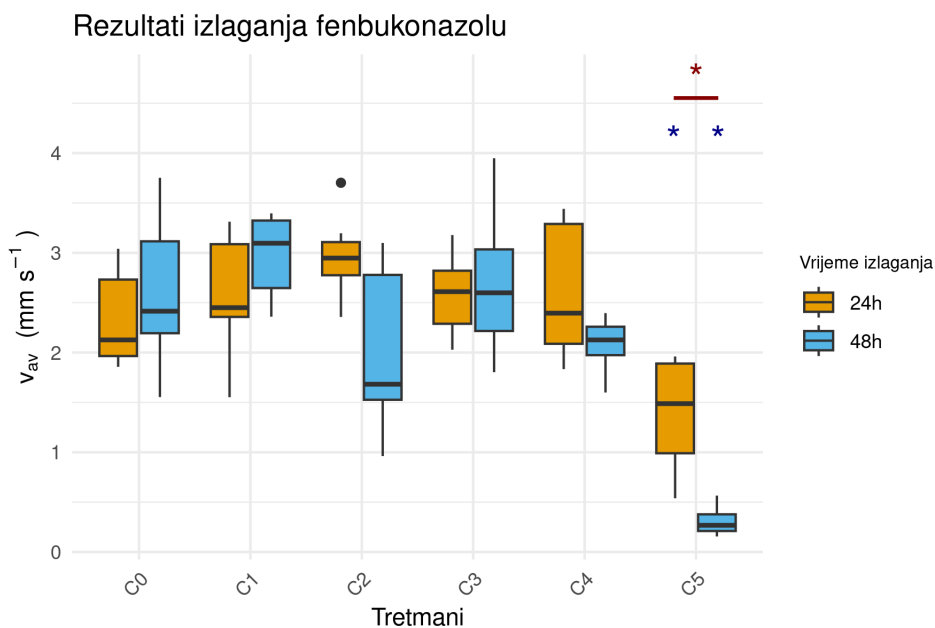
Slika 17. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 18). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s DIF pri koncentraciji C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod DIF pri koncentracijama C3 i C4. Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentraciji C3 DIF.



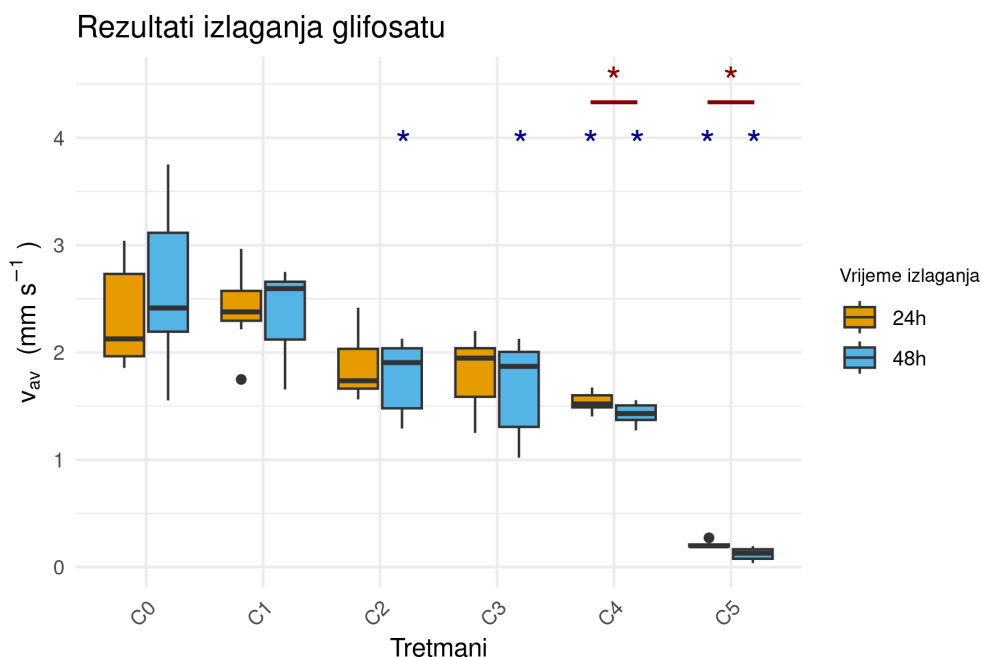
Slika 18. Utjecaj difenkonazola (DIF) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 19). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s FEN pri koncentraciji C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s FEN pri koncentraciji C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentraciji C5 FEN.



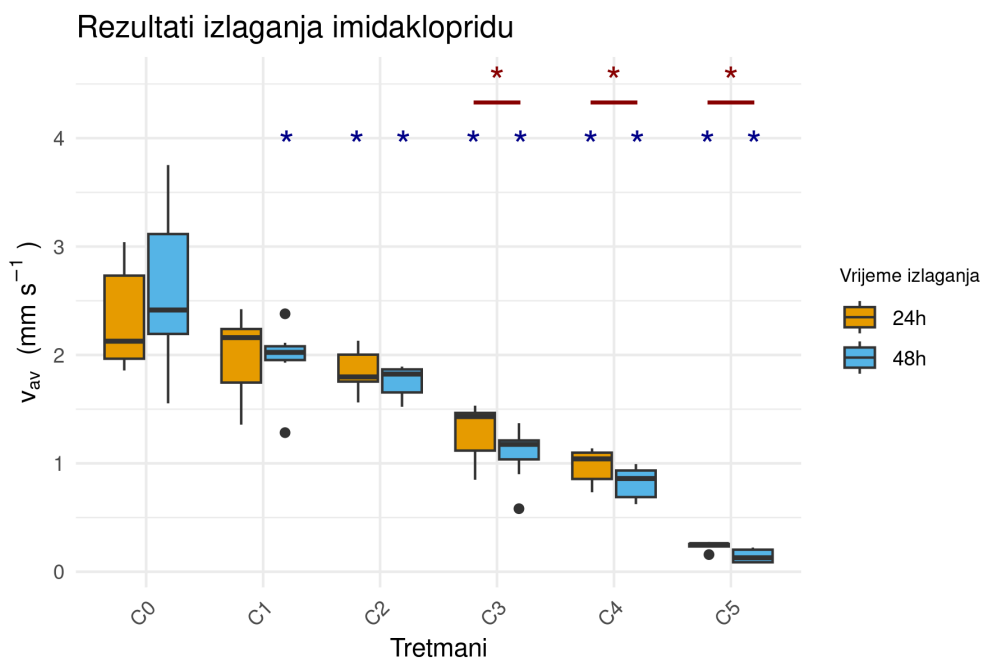
Slika 19. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 20). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 GLY.



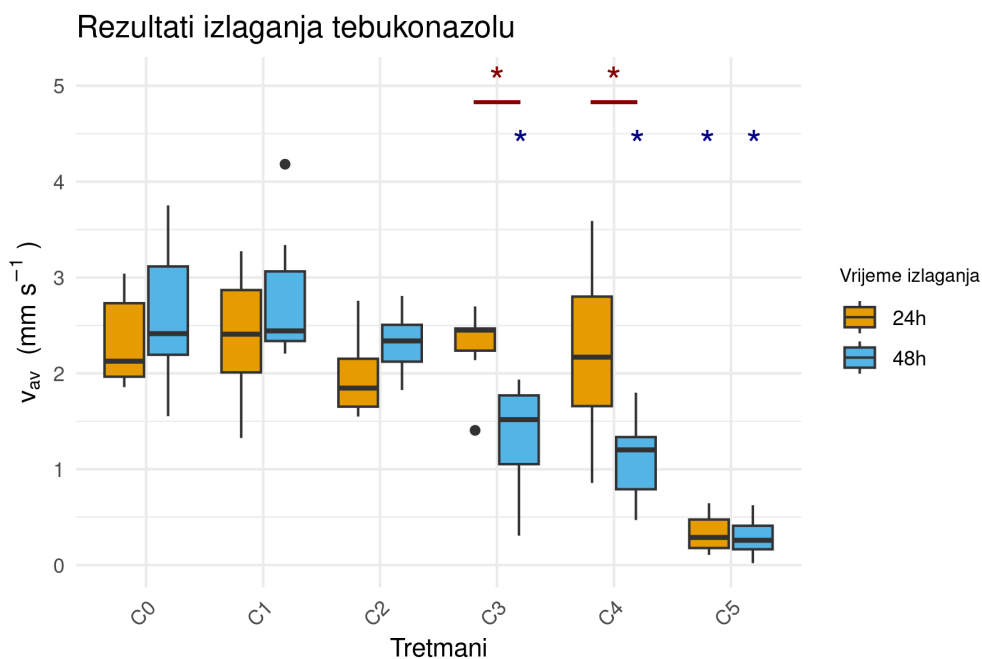
Slika 20. Utjecaj glifosata (GLY) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 21). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri svim koncentracijama (C1-C5). Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C3, C4 i C5 IMI.



Slika 21. Utjecaj imidakloprida (IMI) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

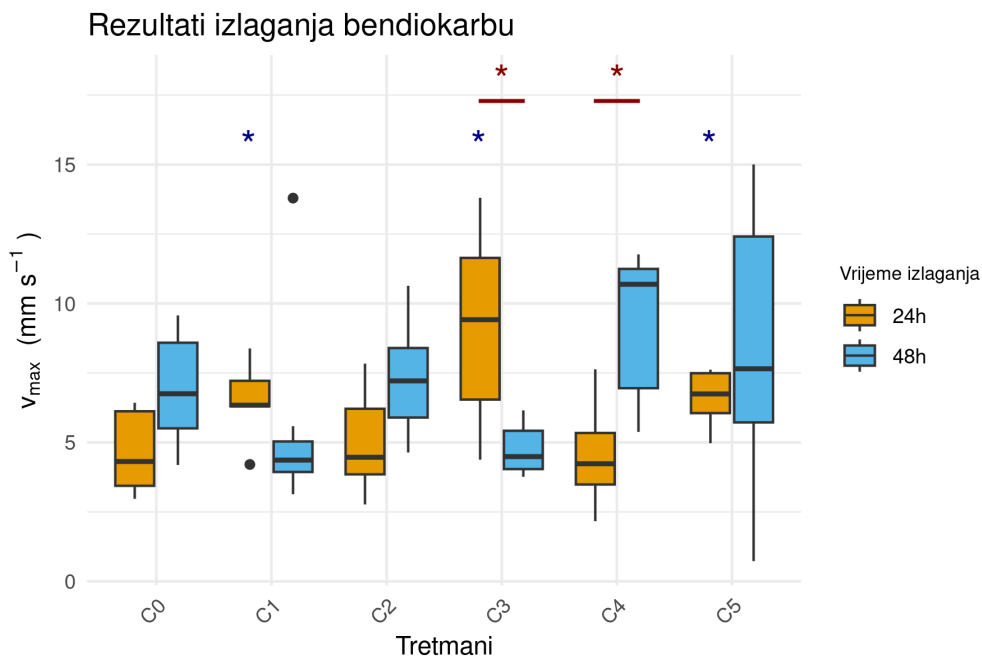
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina plivanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 22). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s TEB pri koncentraciji C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s TEB pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C3 i C4 TEB.



Slika 22. Utjecaj tebukonazola (TEB) na srednju brzinu plivanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina plivanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

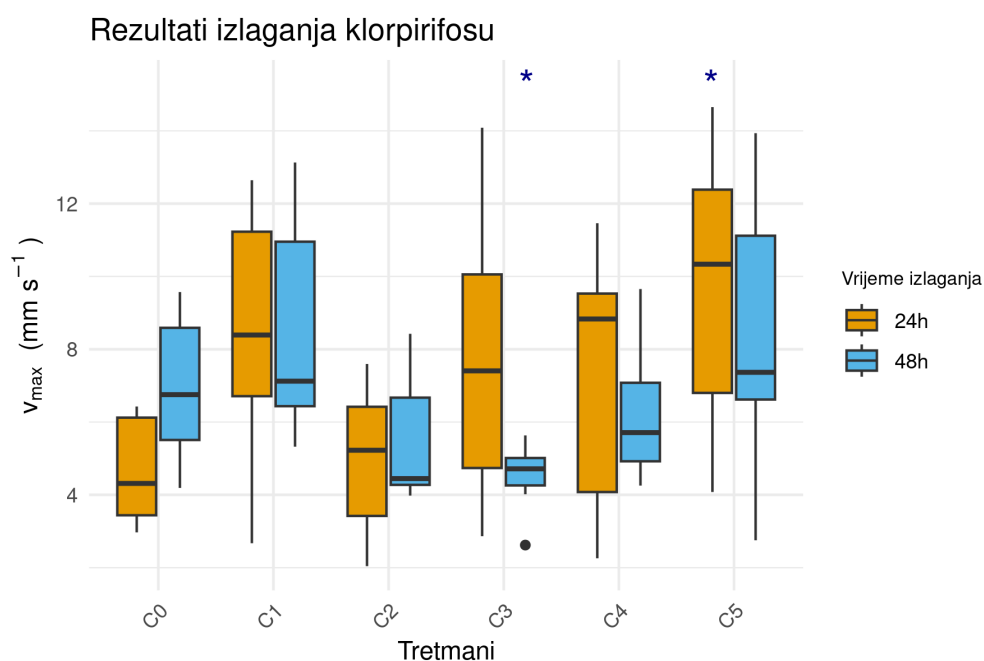
4.1.1.2. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na maksimalnu brzinu plivanja organizama (v_{max})

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 23). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C1, C3 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana i kontrolne grupe. Statistički značajne razlike između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C3 i C4 BDC.



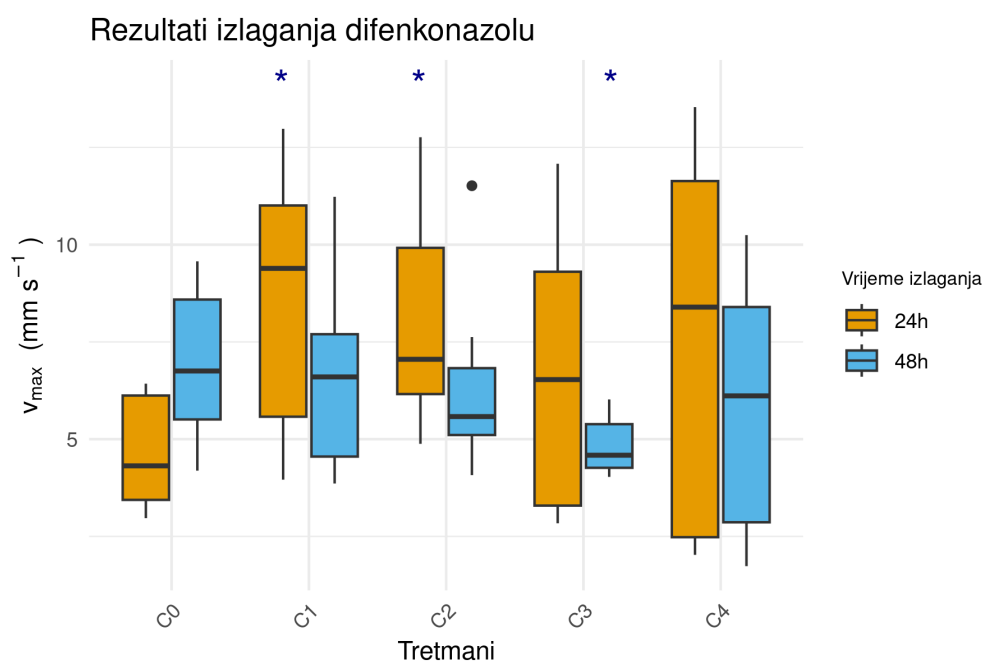
Slika 23. Utjecaj bendiokarba (BDC) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 24). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s CHP pri koncentraciji C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s CHP pri koncentraciji C3. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati unutar pojedinih eksperimentalnih grupa.



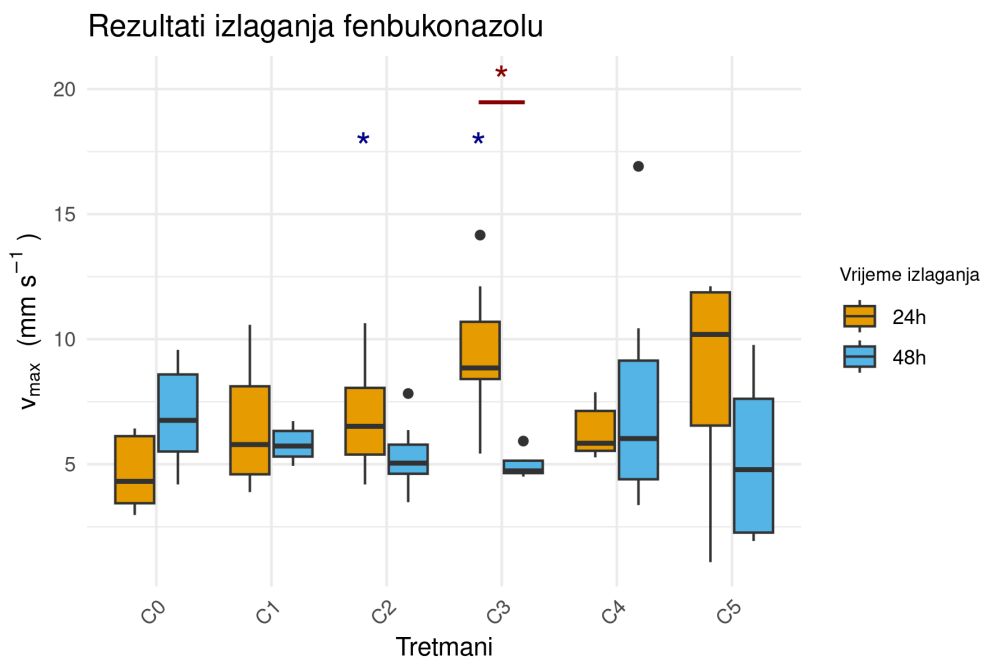
Slika 24. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 25). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C1 i C2. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s DIF pri koncentraciji C3. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati unutar pojedinih eksperimentalnih grupa.



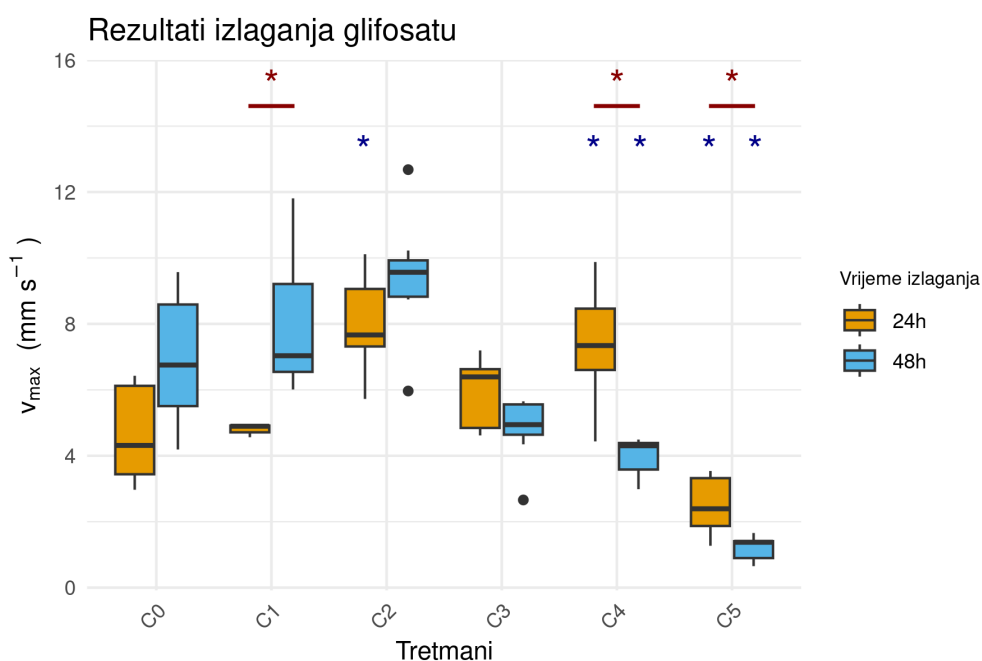
Slika 25. Utjecaj difenkonazola (DIF) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 26). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C2 i C3. Nakon 48 sati izloženosti, nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajna razlika između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C3 FEN.



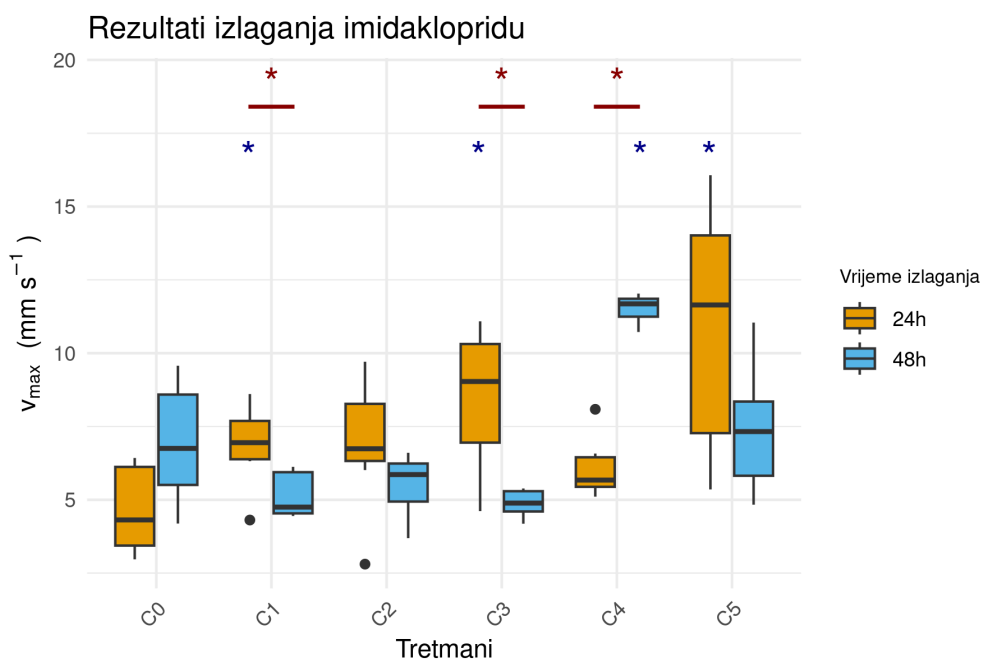
Slika 26. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 27). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C4 i C5. Statistički značajne razlike između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C4 i C5 GLY.



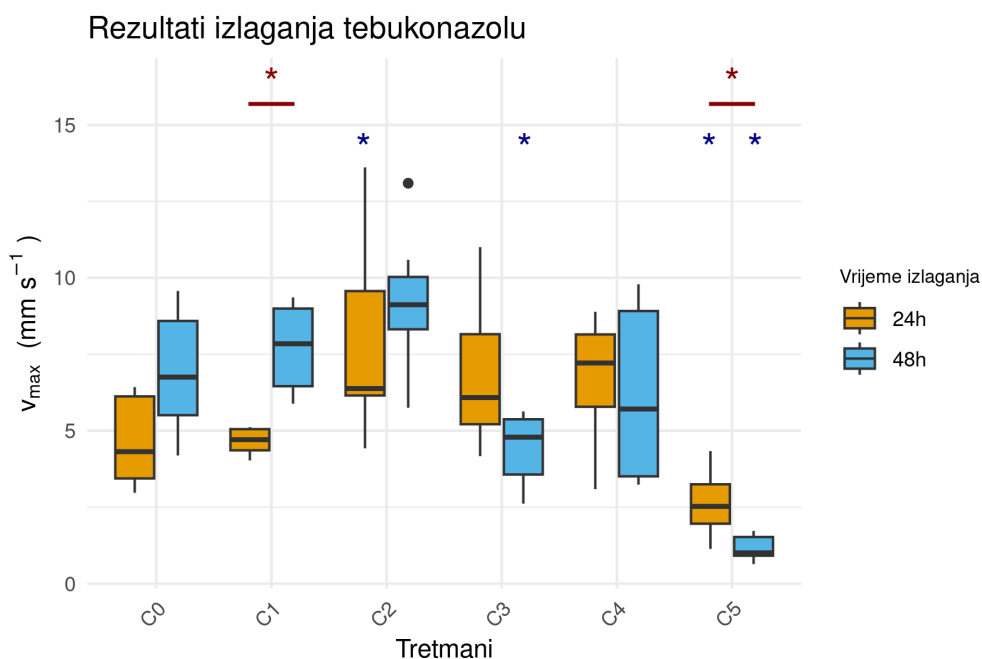
Slika 27. Utjecaj glifosata (GLY) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 28). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C1, C3 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s IMI pri koncentraciji C4. Statistički značajne razlike između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C3 i C4 IMI.



Slika 28. Utjecaj imidakloprida (IMI) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

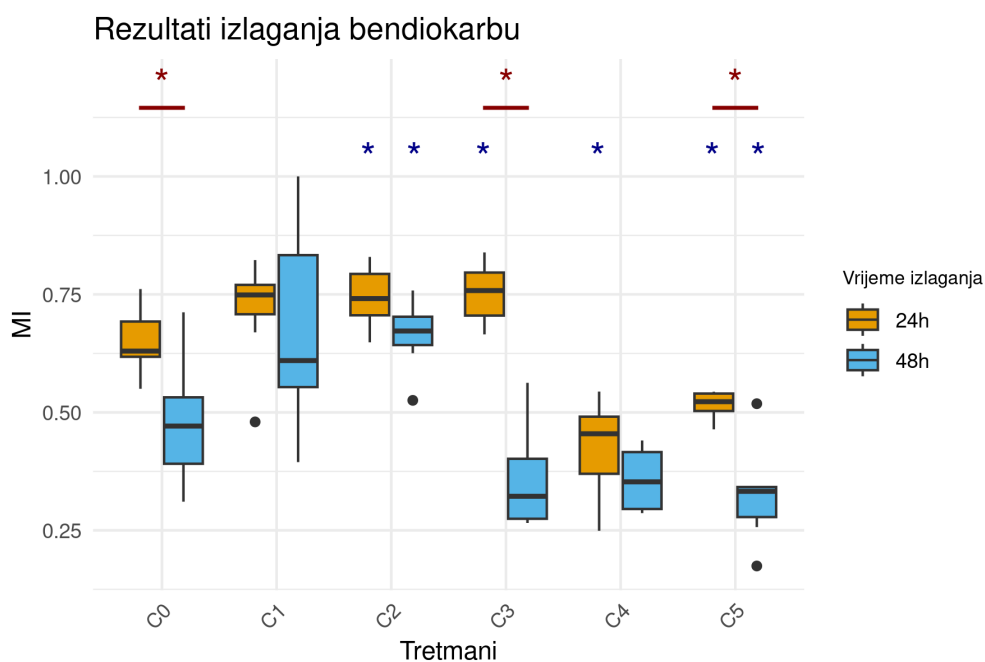
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna brzina plivanja (v_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 29). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s TEB pri koncentracijama C2 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s TEB pri koncentracijama C3 i C5. Statistički značajne razlike između maksimalne brzine plivanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1 i C5 TEB.



Slika 29. Utjecaj tebukonazola (TEB) na maksimalnu brzinu plivanja (v_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna brzina plivanja (v_{max}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

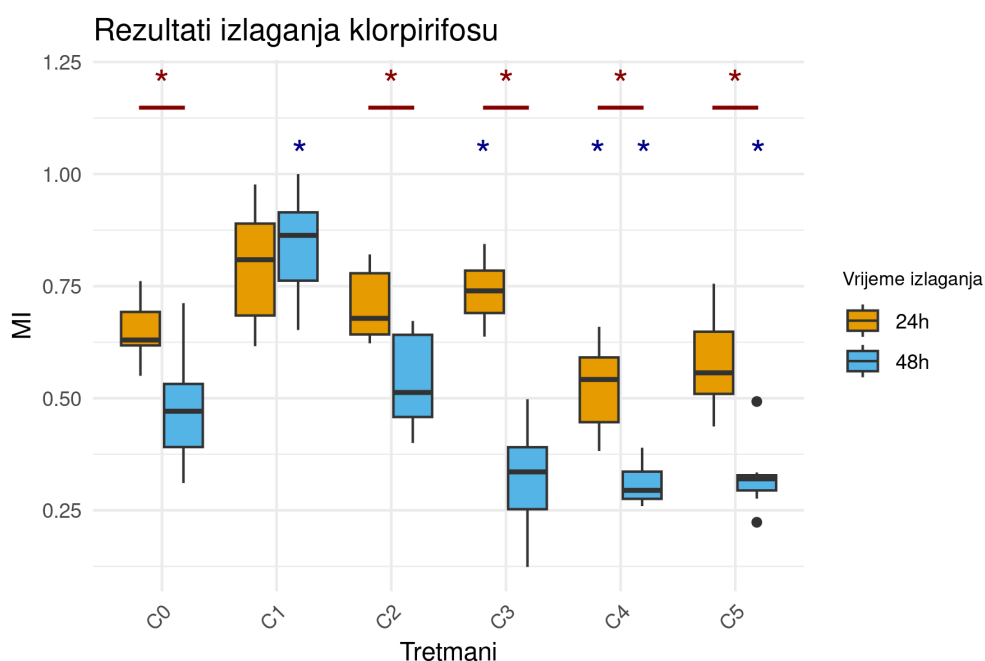
4.1.1.3. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na indeks pokretljivosti (MI)

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (MI) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 30). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C2 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C3 i C5 BDC.



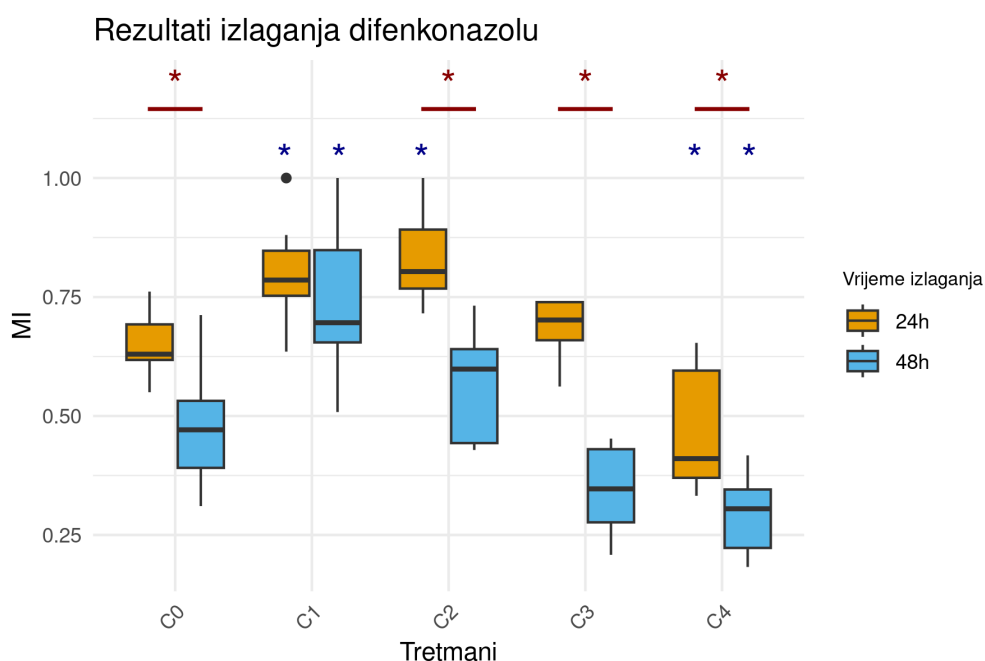
Slika 30. Utjecaj bendiokarba (BDC) na indeks pokretljivosti (MI) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (MI), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (*MI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 31). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C3 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod CHP pri koncentracijama C1, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 CHP.



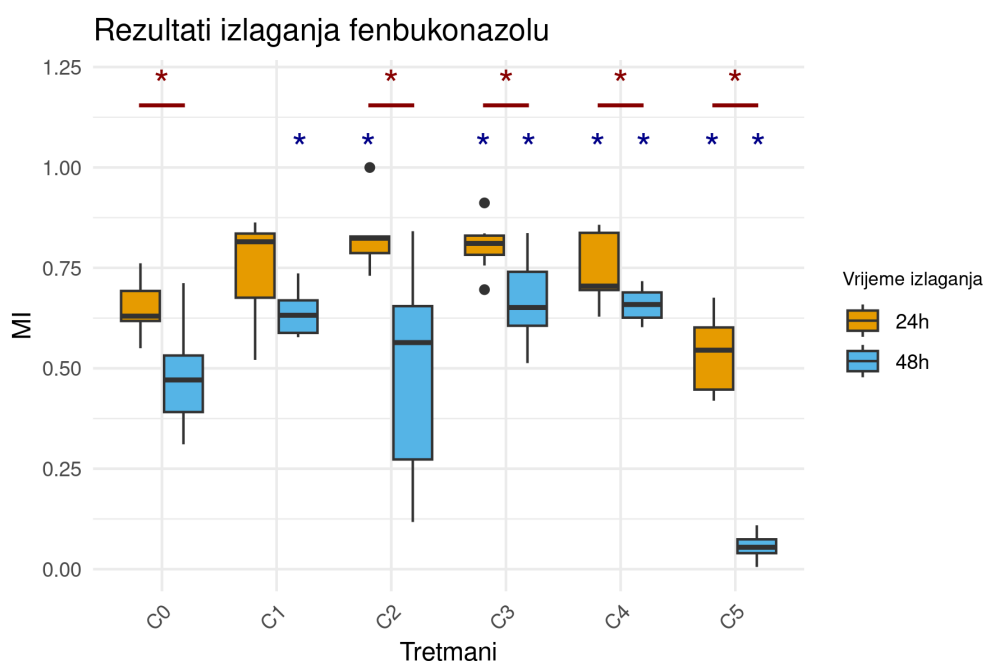
Slika 31. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na indeks pokretljivosti (*MI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (*MI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (*MI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 32). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C1, C2 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod DIF pri koncentracijama C1 i C4. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C2, C3 i C4 DIF.



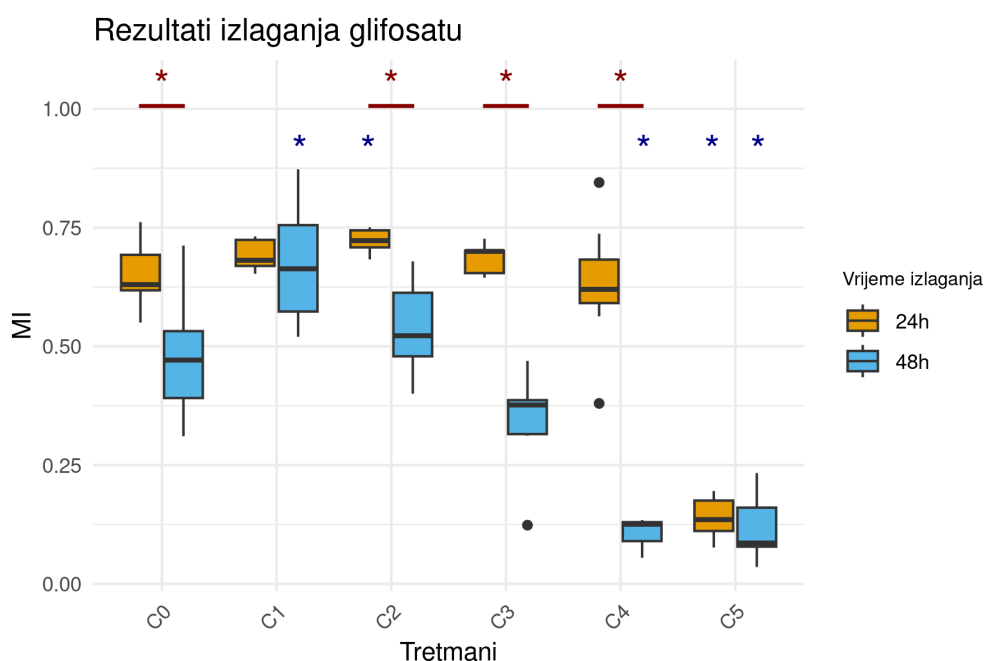
Slika 32. Utjecaj difenkonazola (DIF) na indeks pokretljivosti (*MI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (*MI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (*MI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 33). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod FEN pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 FEN.



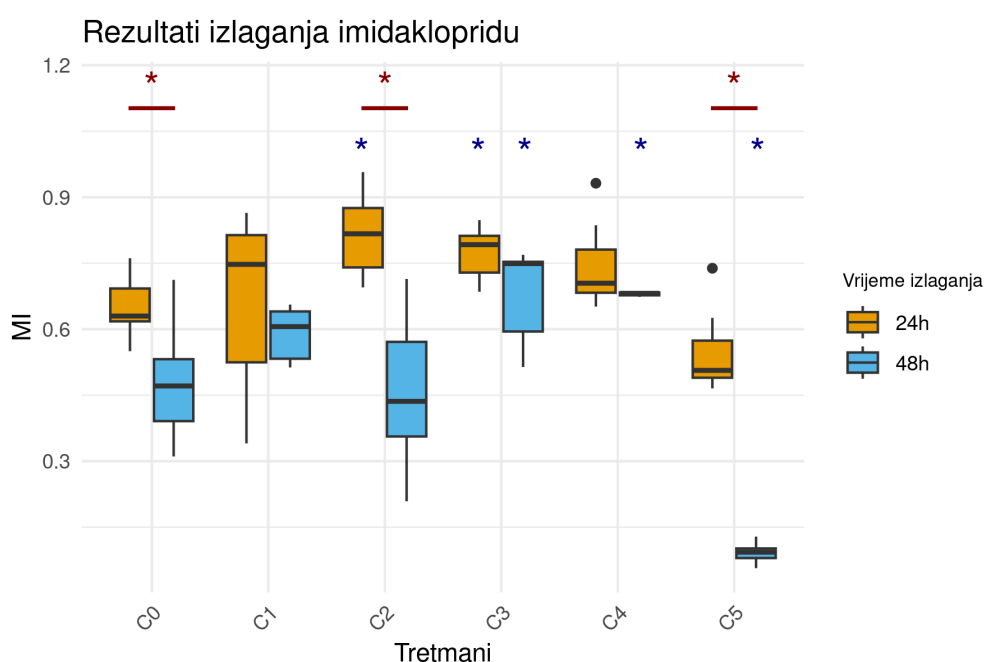
Slika 33. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na indeks pokretljivosti (*MI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (*MI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (*MI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 34). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C2 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod GLY pri koncentracijama C1, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C2, C3 i C4 GLY.



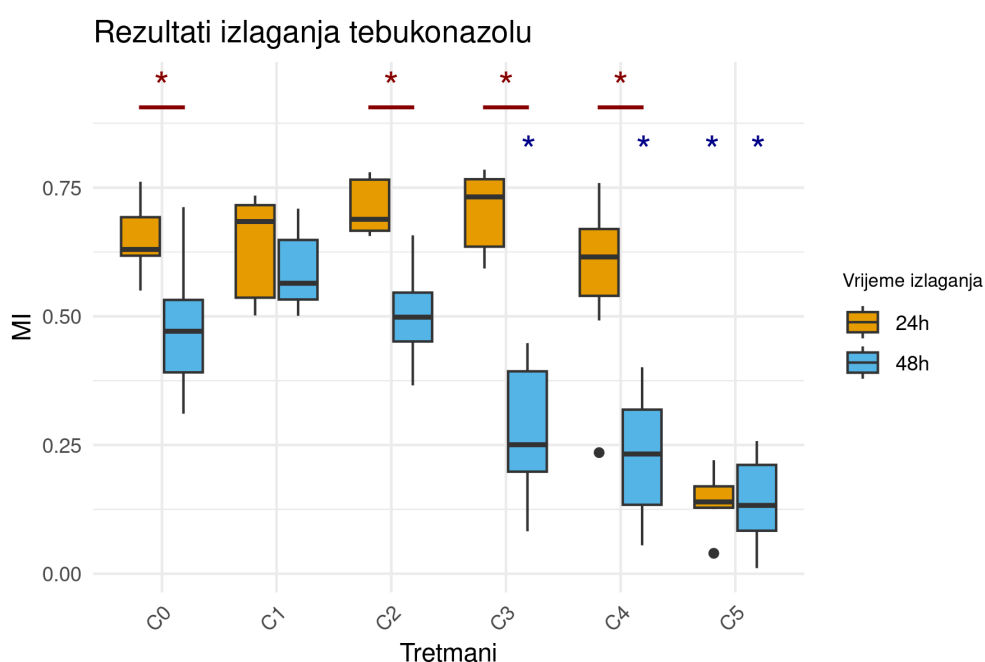
Slika 34. Utjecaj glifosata (GLY) na indeks pokretljivosti (*MI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (*MI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidaklopid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (*MI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 35). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C2 i C3. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod IMI pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C2 i C5 IMI.



Slika 35. Utjecaj imidakloprida (IMI) na indeks pokretljivosti (*MI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (*MI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

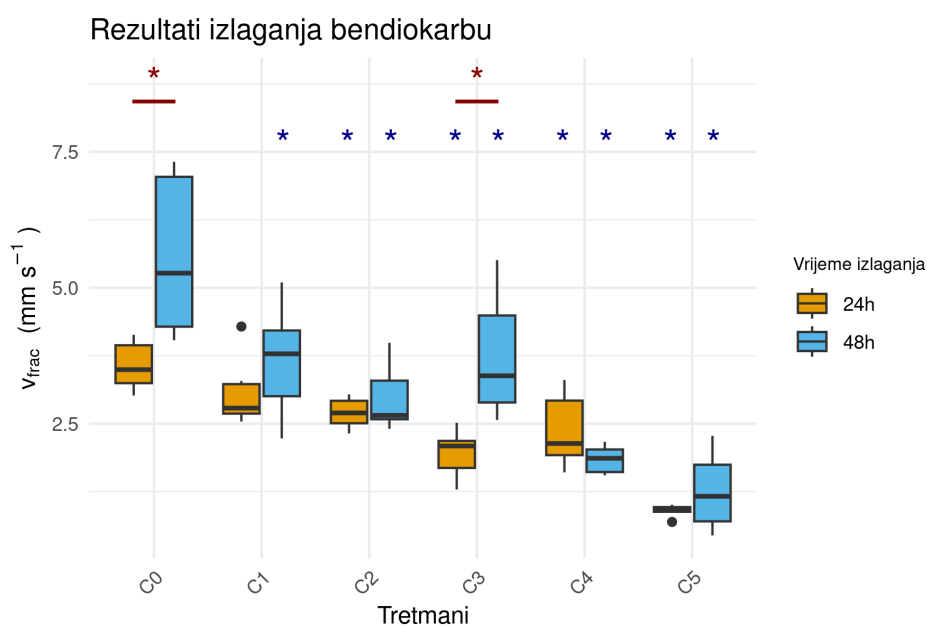
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti (*MI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 36). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa pri većim koncentracijama zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s TEB pri koncentracijama C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod TEB pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C2, C3 i C4 TEB.



Slika 36. Utjecaj tebukonazola (TEB) na indeks pokretljivosti (*MI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti (*MI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

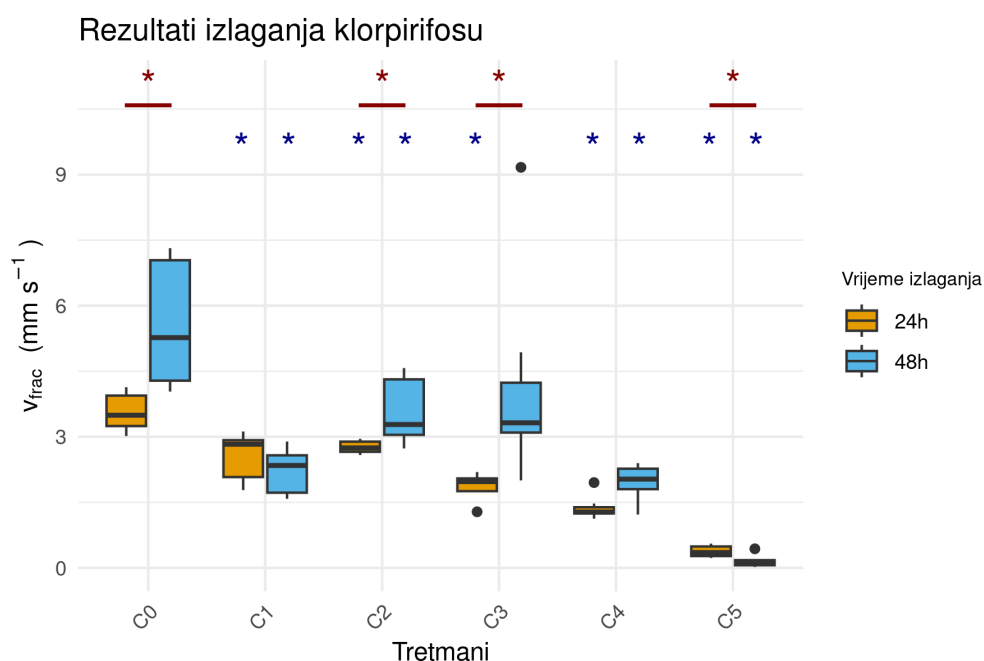
4.1.1.4. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na prosječnu frakcijsku brzinu (v_{frac})

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 37). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su pri svim koncentracijama BDC (C1-C5). Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentraciji C3 BDC.



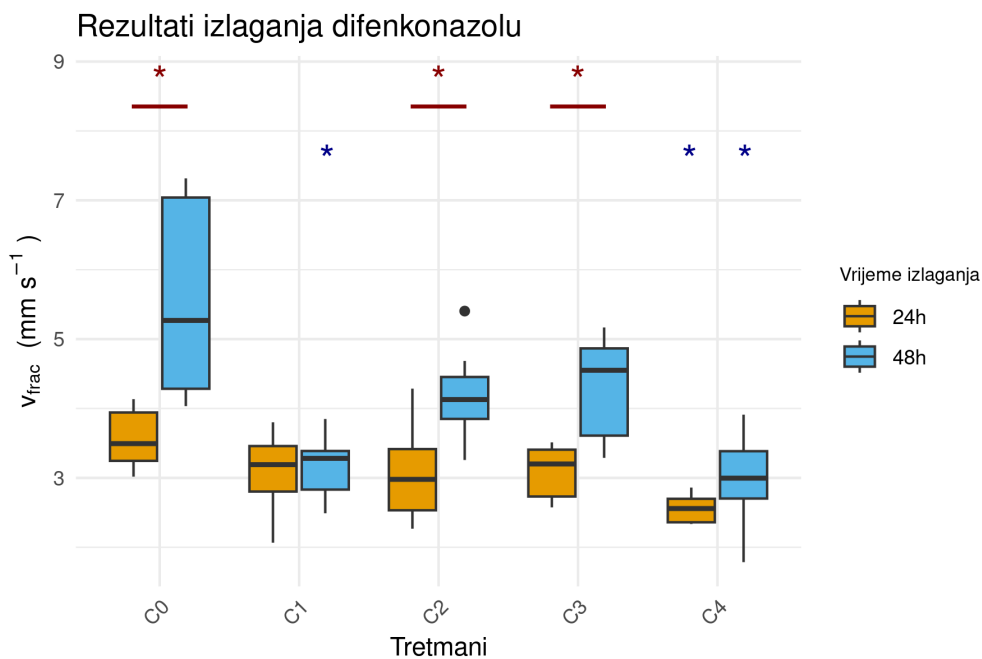
Slika 37. Utjecaj bendiokarba (BDC) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 38). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim koncentracijama CHP (C1-C5). Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentracijama C2, C3 i C5 CHP.



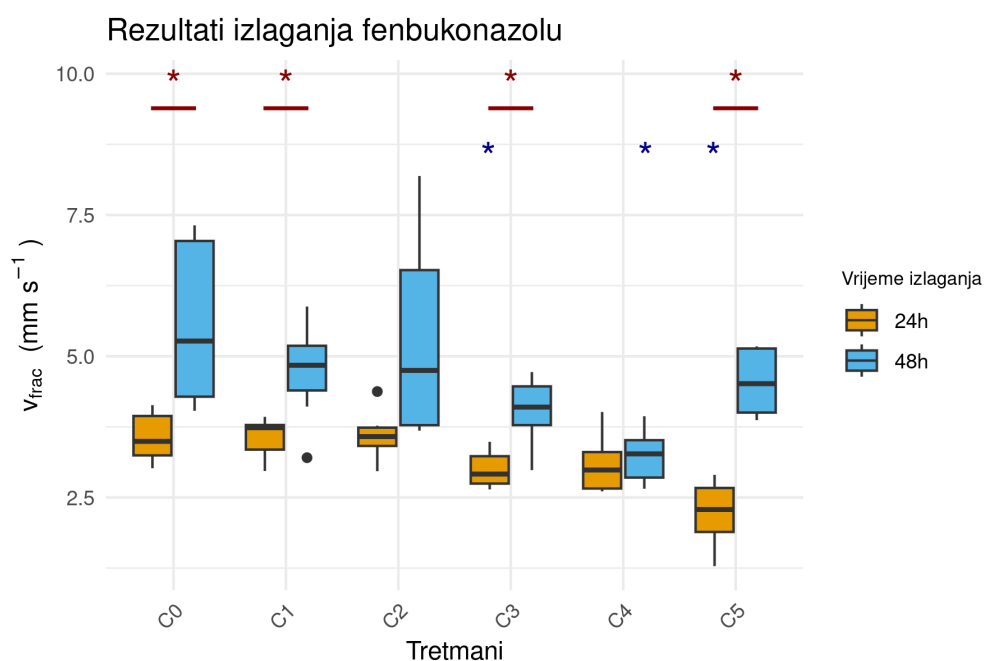
Slika 38. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 39). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je pri koncentraciji C4 DIF. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C1 i C4. Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentracijama C2 i C3 DIF.



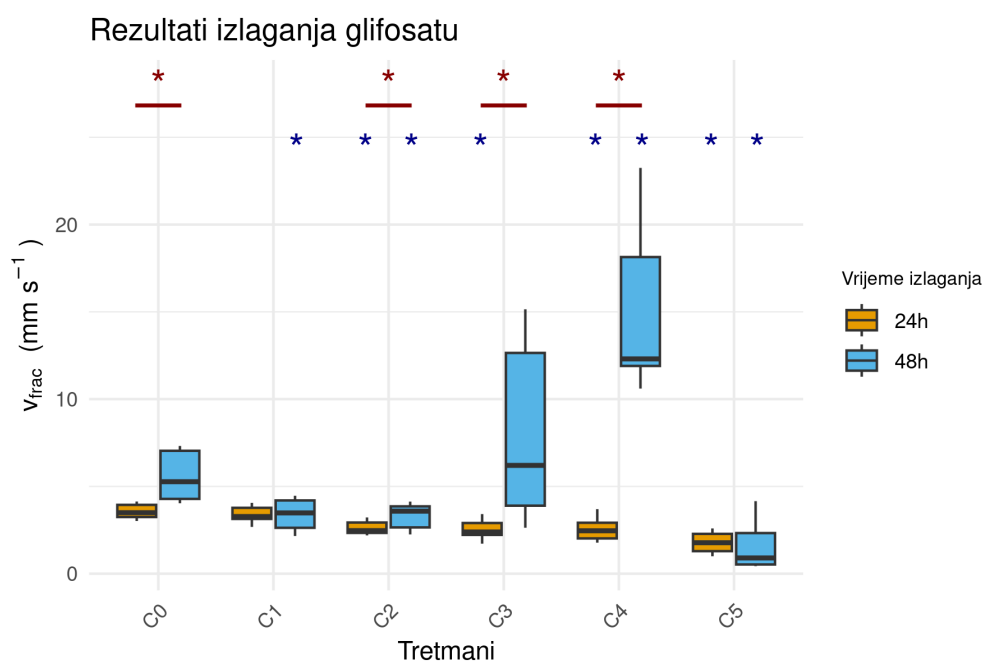
Slika 39. Utjecaj difenkonazola (DIF) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 40). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je pri koncentracijama C3 i C5 FEN. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je kod tretmana s FEN pri koncentraciji C4. Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentracijama C1, C3 i C5 FEN.



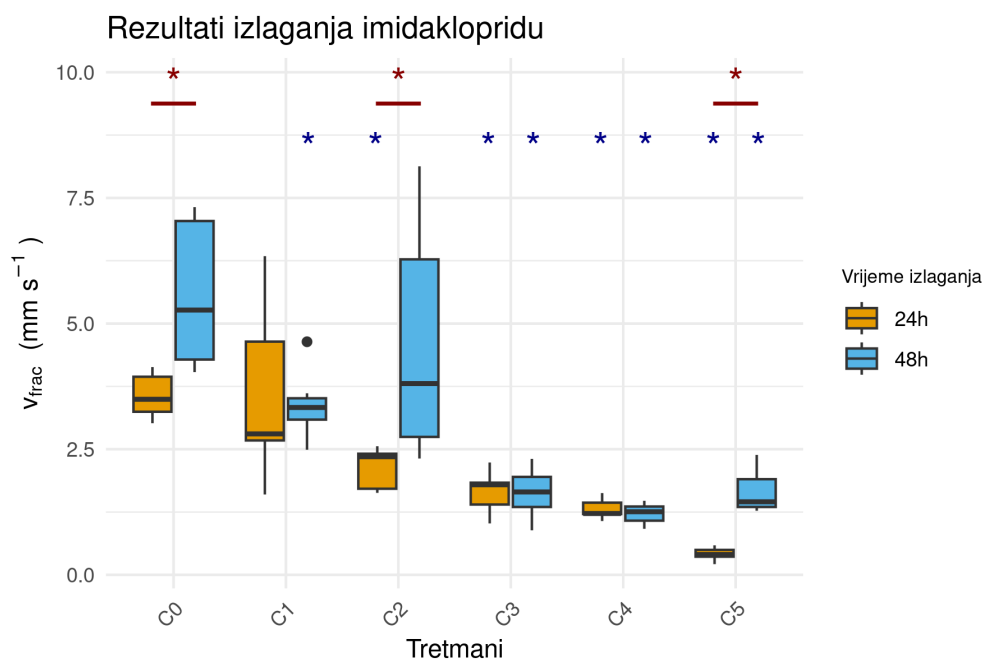
Slika 40. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 41). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 GLY. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s GLY pri koncentraciji C1, C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentracijama C2, C3 i C4 GLY.



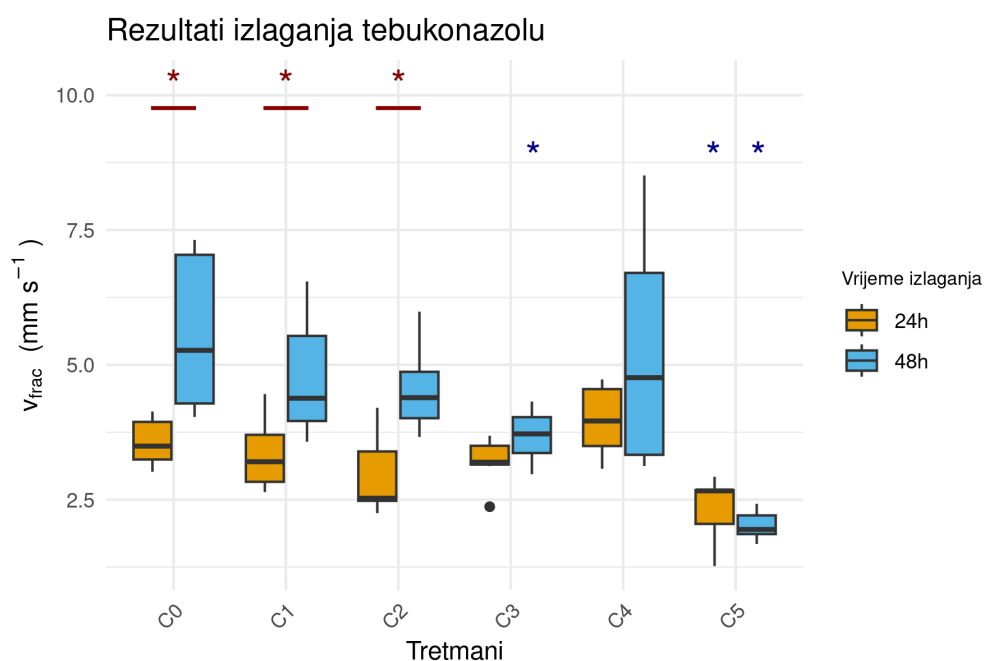
Slika 41. Utjecaj glifosata (GLY) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidaklopid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 42). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 IMI. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentracijama C2 i C5 IMI.



Slika 42. Utjecaj imidakloprida (IMI) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

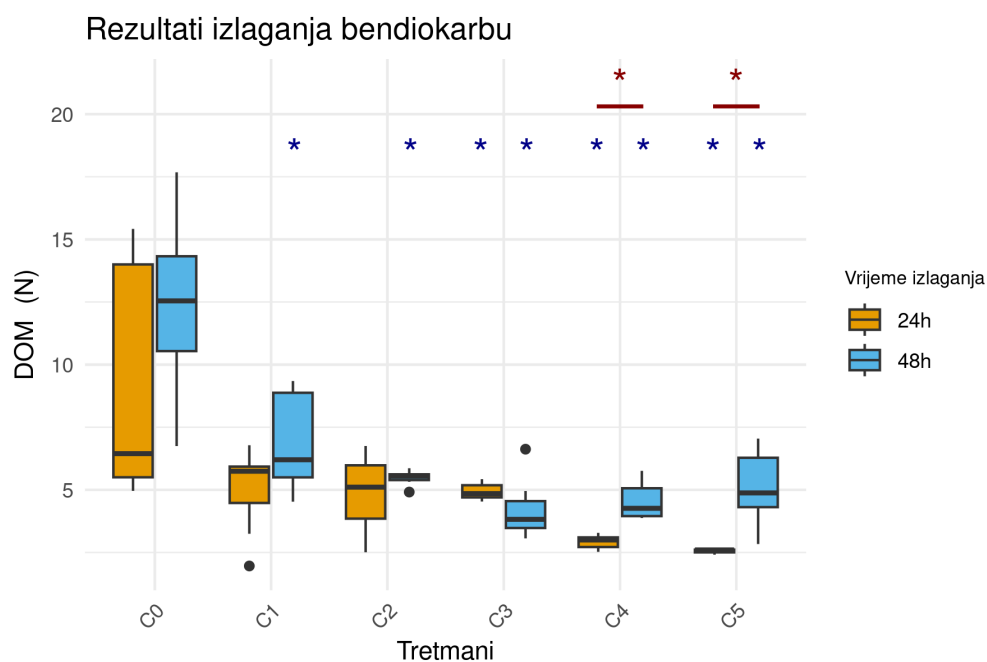
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 43). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je pri koncentracija C5 TEB. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s TEB pri koncentracijama C3 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne frakcijske brzine nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri kontrolnoj grupi i koncentracijama C1 i C2 TEB.



Slika 43. Utjecaj tebukonazola (TEB) na prosječnu frakcijsku brzinu plivanja (v_{frac}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna frakcijska brzina plivanja (v_{frac}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

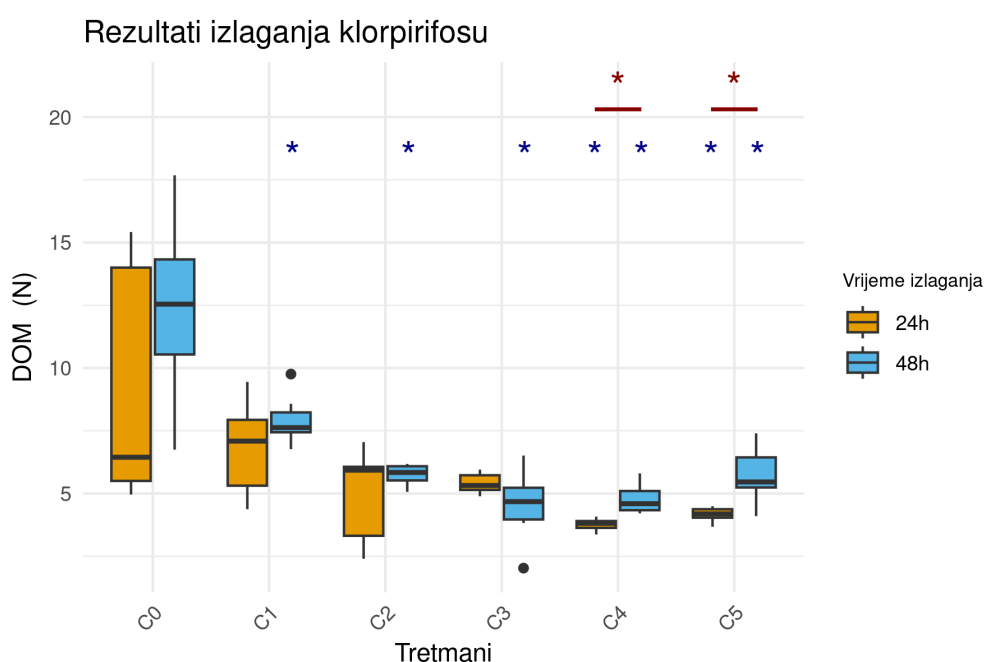
4.1.1.5. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na diskontinuitet kretanja (DOM)

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (DOM) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 44). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod svih koncentracija (C1-C5) BDC. Statistički značajne razlike između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 BDC.



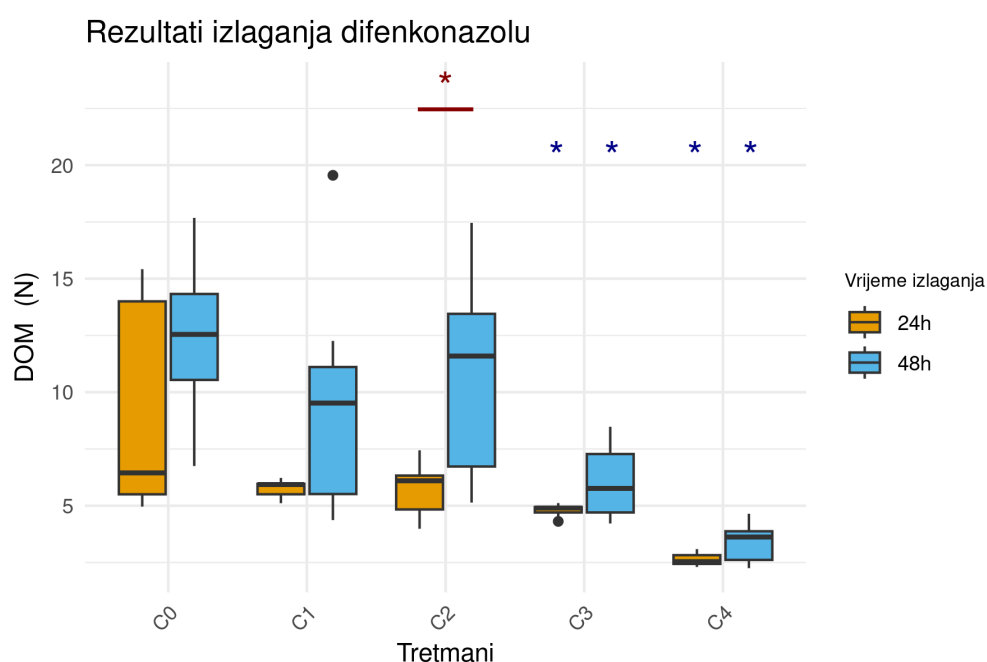
Slika 44. Utjecaj bendiokarba (BDC) na diskontinuitet kretanja (DOM) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (DOM), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (*DOM*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 45). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod svih koncentracija (C1-C5) CHP. Statistički značajne razlike između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 CHP.



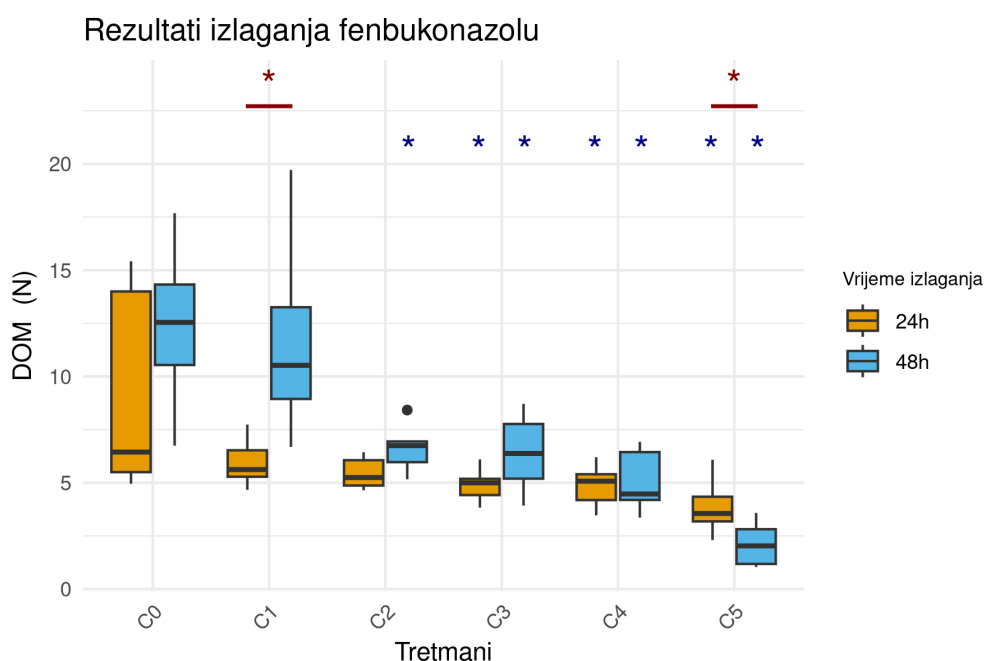
Slika 45. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na diskontinuitet kretanja (*DOM*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (*DOM*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (*DOM*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 46). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C3 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C3 i C4. Statistički značajna razlika između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C2 DIF.



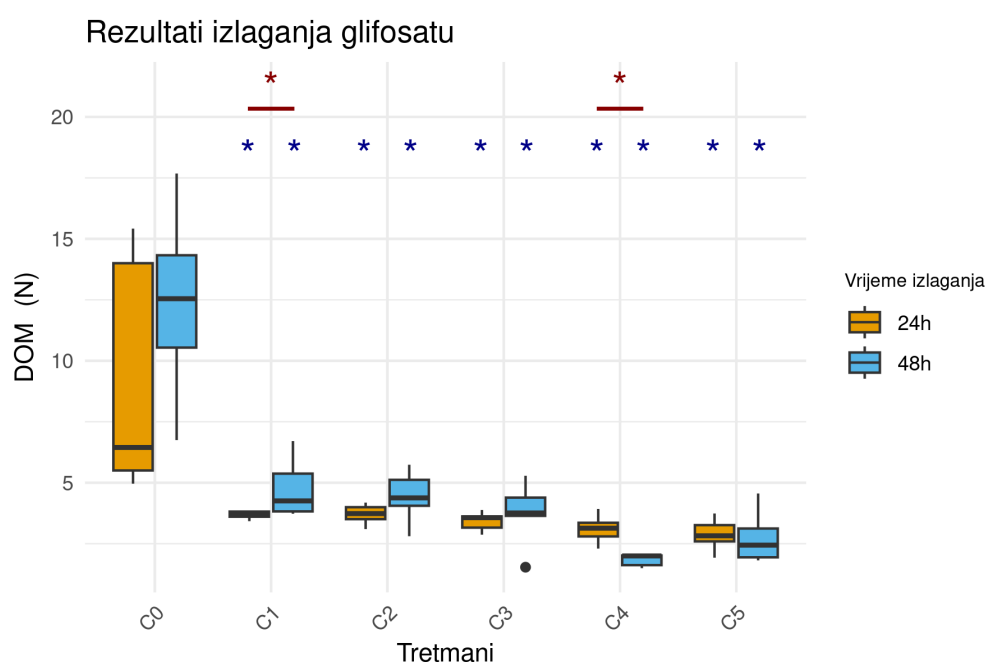
Slika 46. Utjecaj difenkonazola (DIF) na diskontinuitet kretanja (*DOM*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (*DOM*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (*DOM*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 47). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1 i C5 FEN.



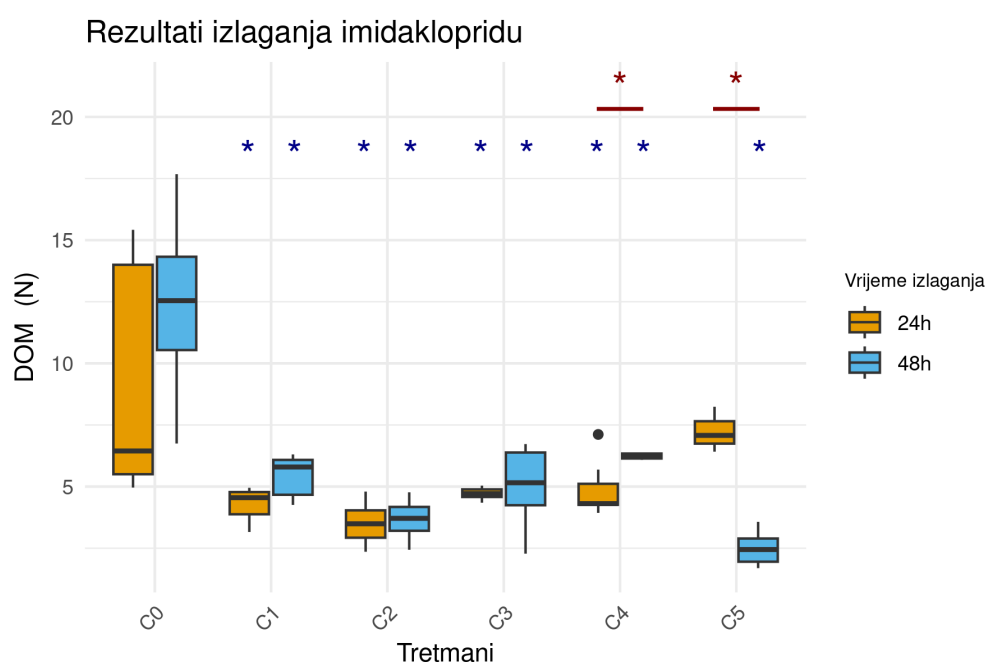
Slika 47. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na diskontinuitet kretanja (*DOM*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (*DOM*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (*DOM*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 48). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim koncentracijama (C1-C5) GLY. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim koncentracijama (C1-C5) GLY. Statistički značajne razlike između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1 i C4 GLY.



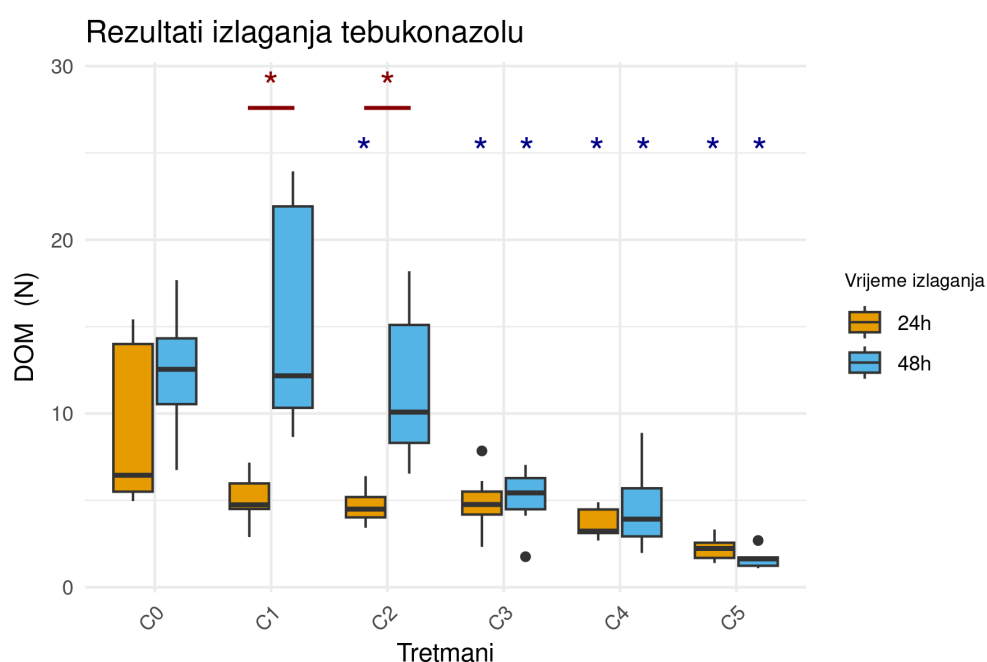
Slika 48. Utjecaj glifosata (GLY) na diskontinuitet kretanja (*DOM*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (*DOM*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (*DOM*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 49). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4 IMI. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim koncentracijama (C1-C5) IMI. Statistički značajne razlike između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 IMI.



Slika 49. Utjecaj imidakloprida (IMI) na diskontinuitet kretanja (*DOM*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (*DOM*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

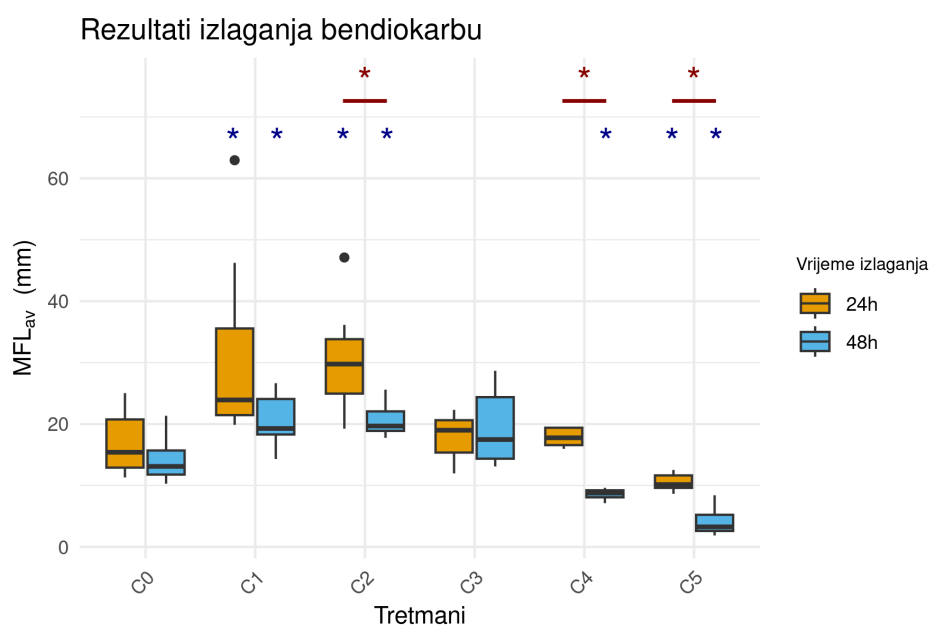
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Diskontinuitet kretanja (*DOM*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 50). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 TEB. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri tretmanima s koncentracijama C3, C4 i C5 TEB. Statistički značajne razlike između diskontinuiteta kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1 i C2 TEB.



Slika 50. Utjecaj tebukonazola (TEB) na diskontinuitet kretanja (*DOM*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je diskontinuitet kretanja (*DOM*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

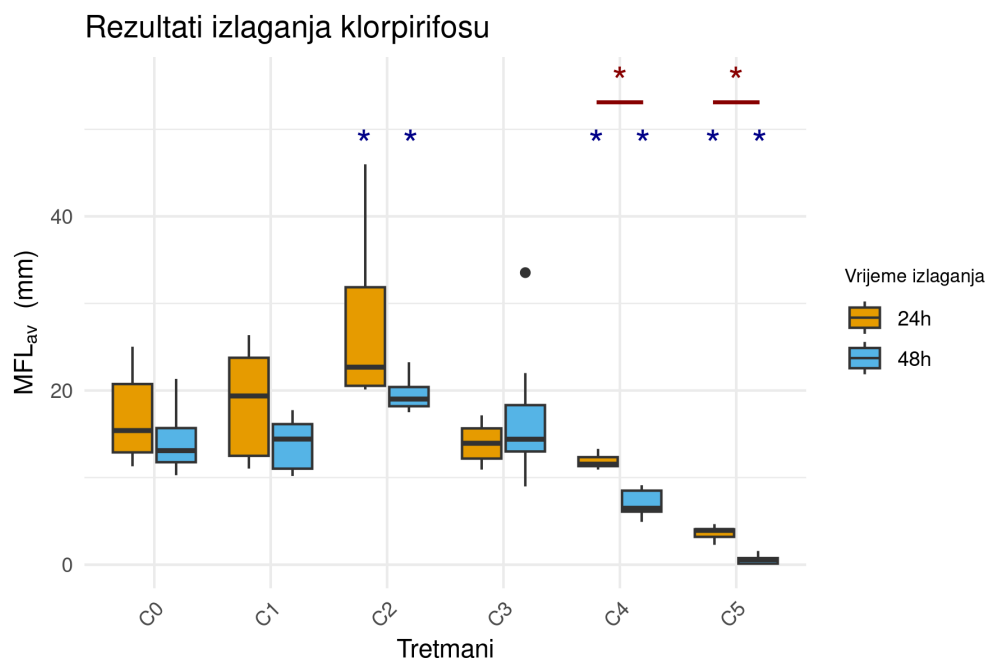
4.1.1.6. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av})

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 51). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C1, C2 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2, C4 i C5 BDC.



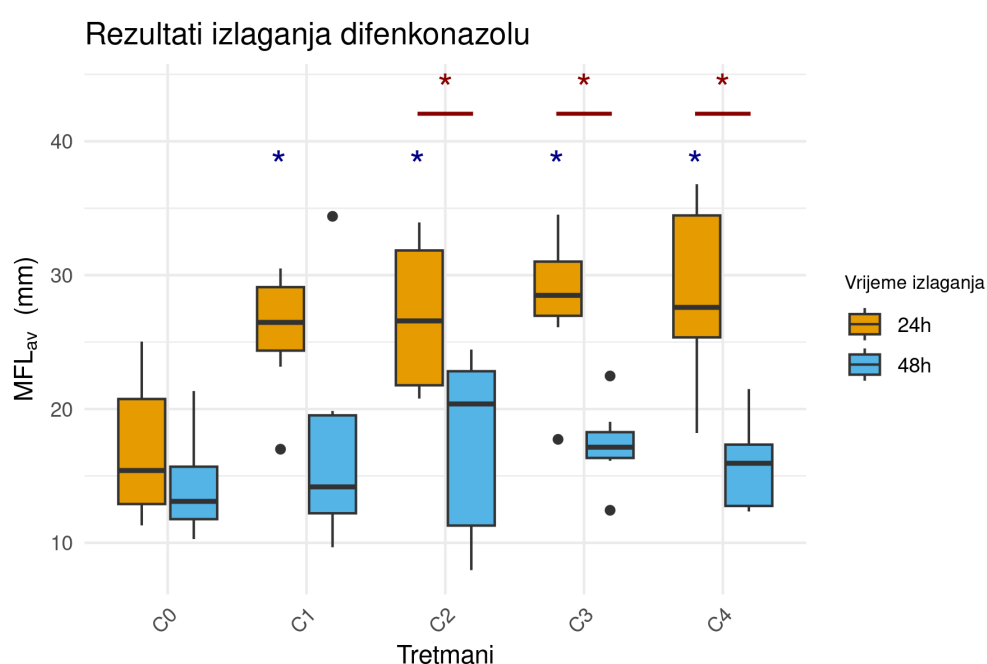
Slika 51. Utjecaj bendiokarba (BDC) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 52). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod CHP pri koncentracijama C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 CHP.



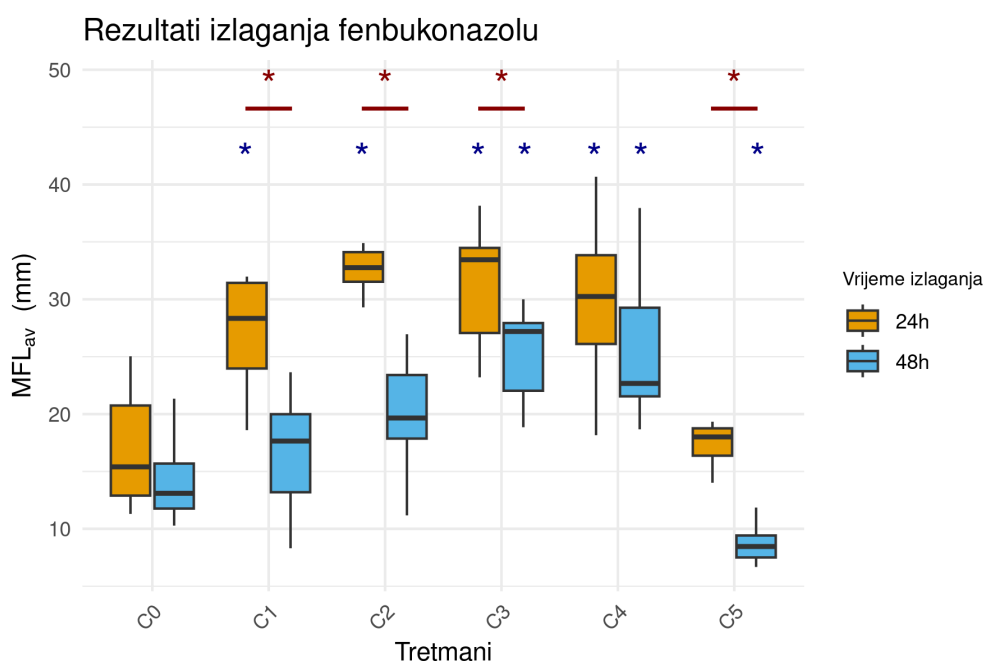
Slika 52. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 53). Nakon 24 sata izlaganja utvrđen je uzlazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala, dok nakon 48 sati izlaganja trend nije naznačen. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2, C3 i C4 DIF.



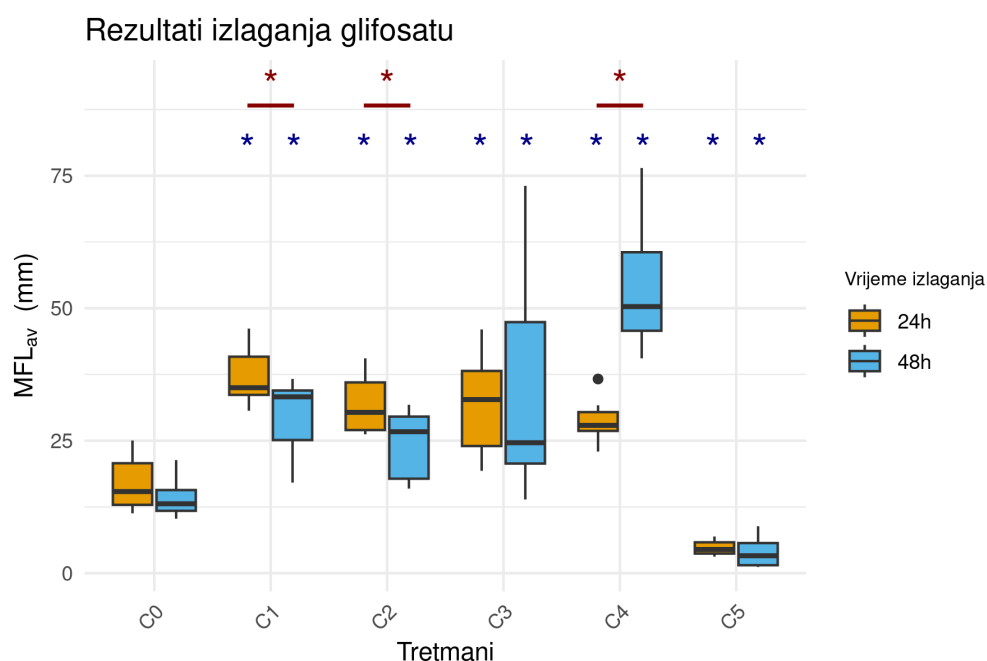
Slika 53. Utjecaj difenkonazola (DIF) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 54). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen smanjenjem pri višim koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod FEN pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C5 FEN.



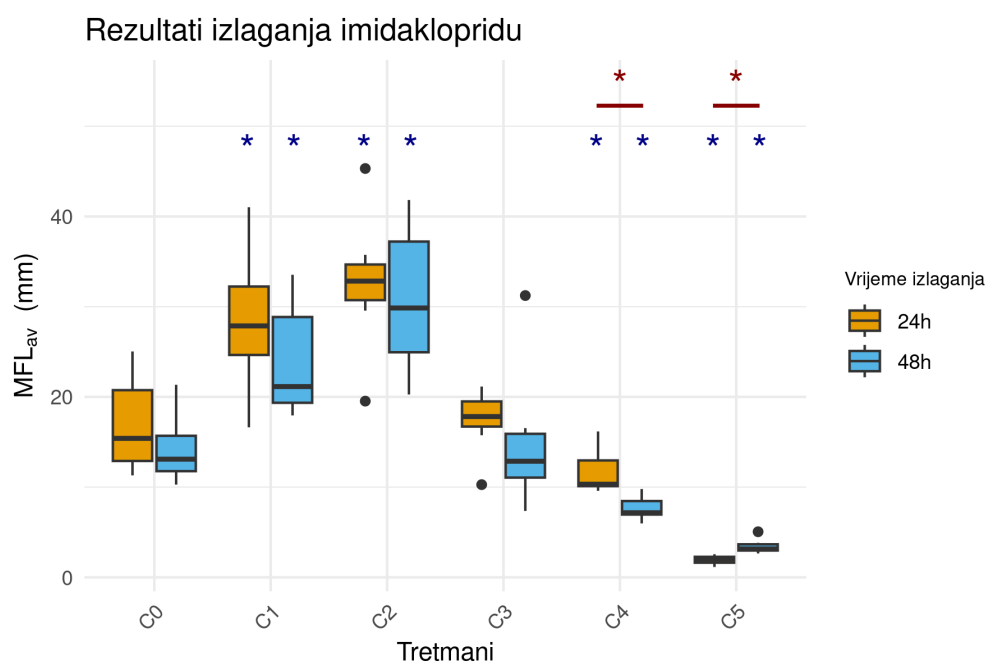
Slika 54. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 55). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen smanjenjem pri višim koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod svih tretmana (C1-C5) s GLY. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod svih tretmana (C1-C5) s GLY. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2 i C4 GLY.



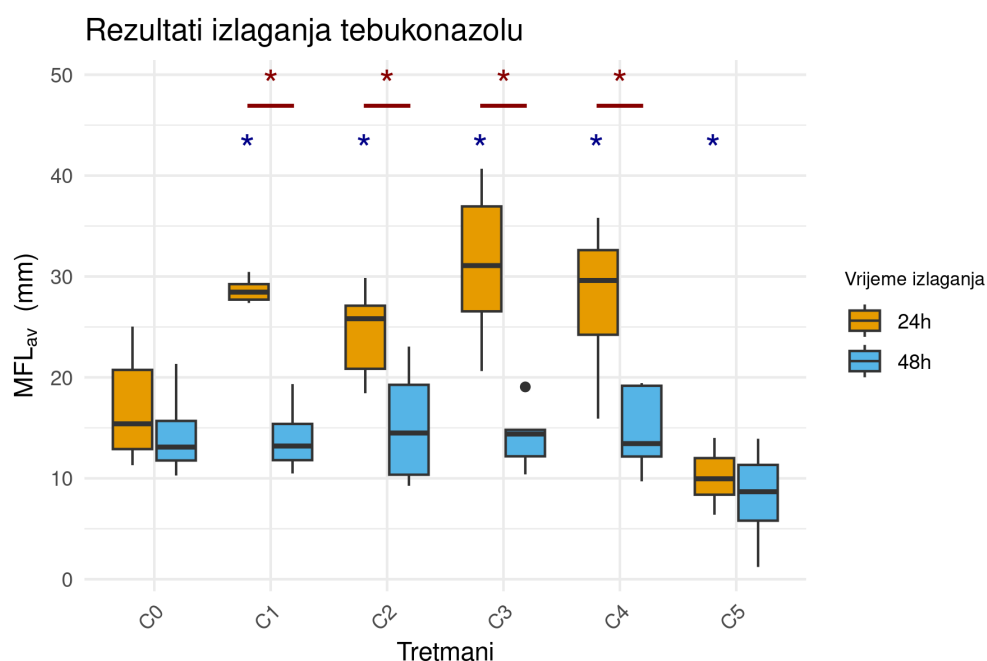
Slika 55. Utjecaj glifosata (GLY) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 56). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen smanjenjem pri višim koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod IMI pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 IMI.



Slika 56. Utjecaj imidakloprida (IMI) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

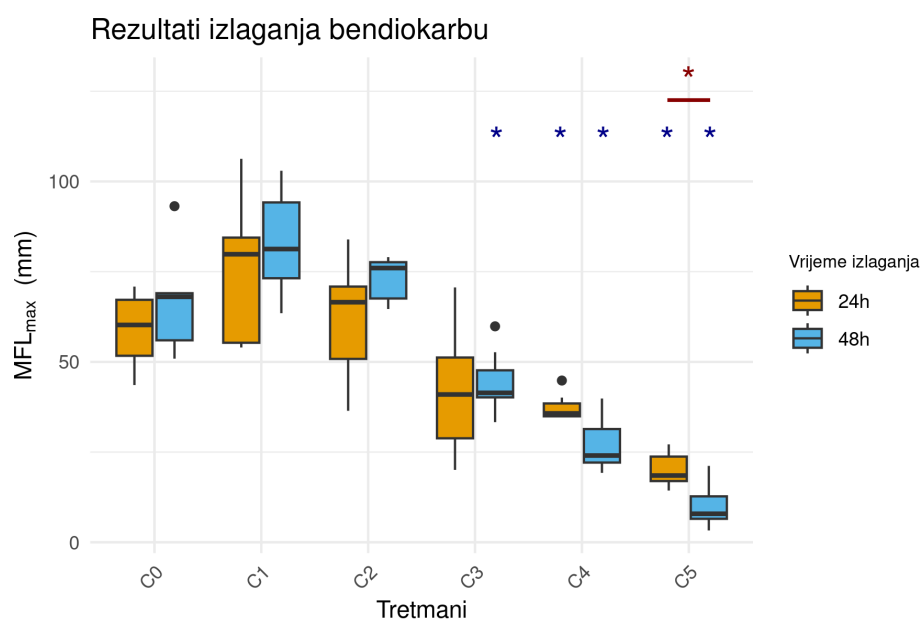
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Prosječna duljina frakcije kretanja (MFL_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 57). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen smanjenjem pri višim koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim tretmanima (C1-C5) s TEB. Nakon 48 sati izloženosti, nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajne razlike između prosječne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4 TEB.



Slika 57. Utjecaj tebukonazola (TEB) na prosječnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je prosječna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

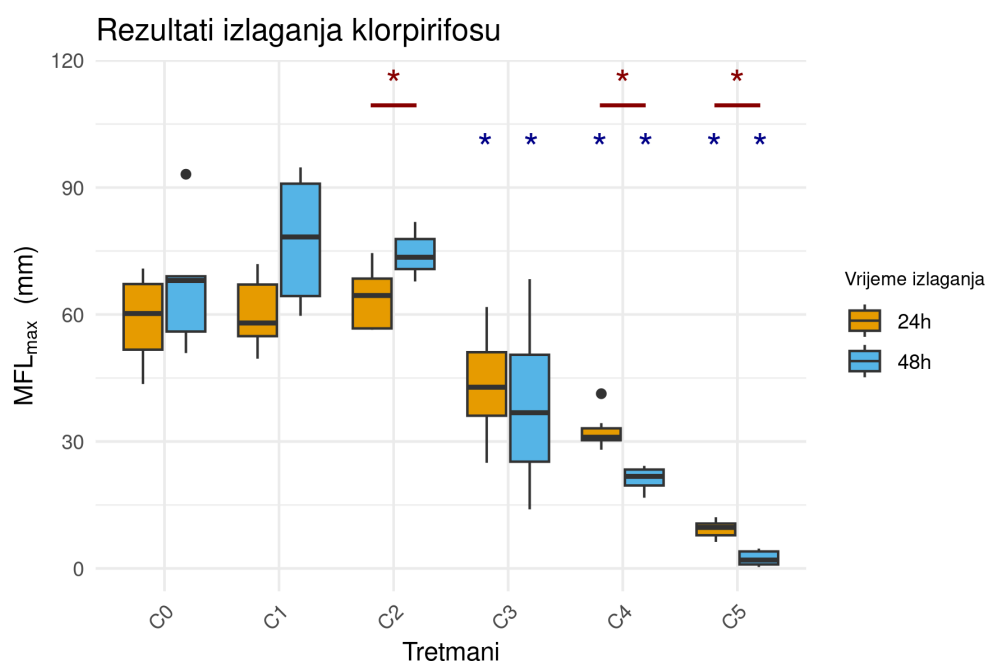
4.1.1.7. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max})

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 58). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C5 BDC.



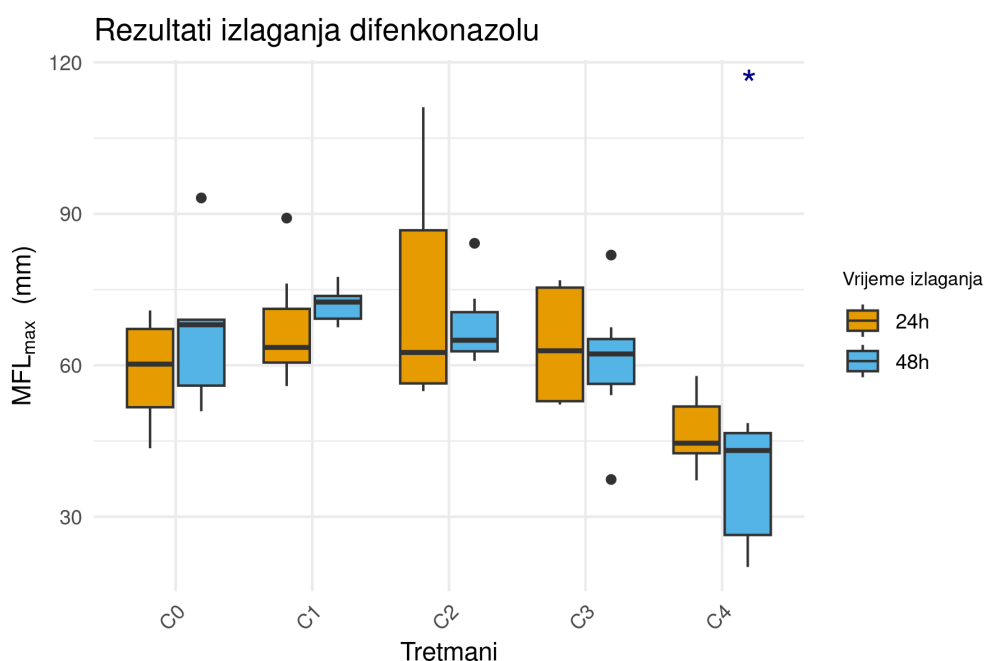
Slika 58. Utjecaj bendiokarba (BDC) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 59). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod CHP pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2, C4 i C5 CHP.



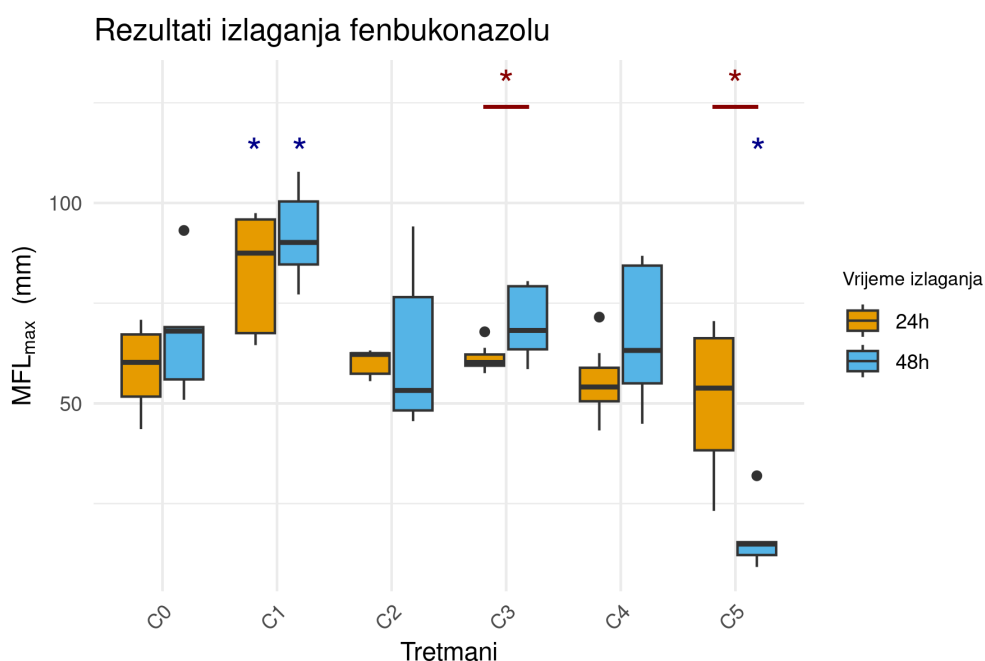
Slika 59. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 60). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata izloženosti. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je kod DIF pri koncentraciji C4. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati unutar pojedinih eksperimentalnih grupa.



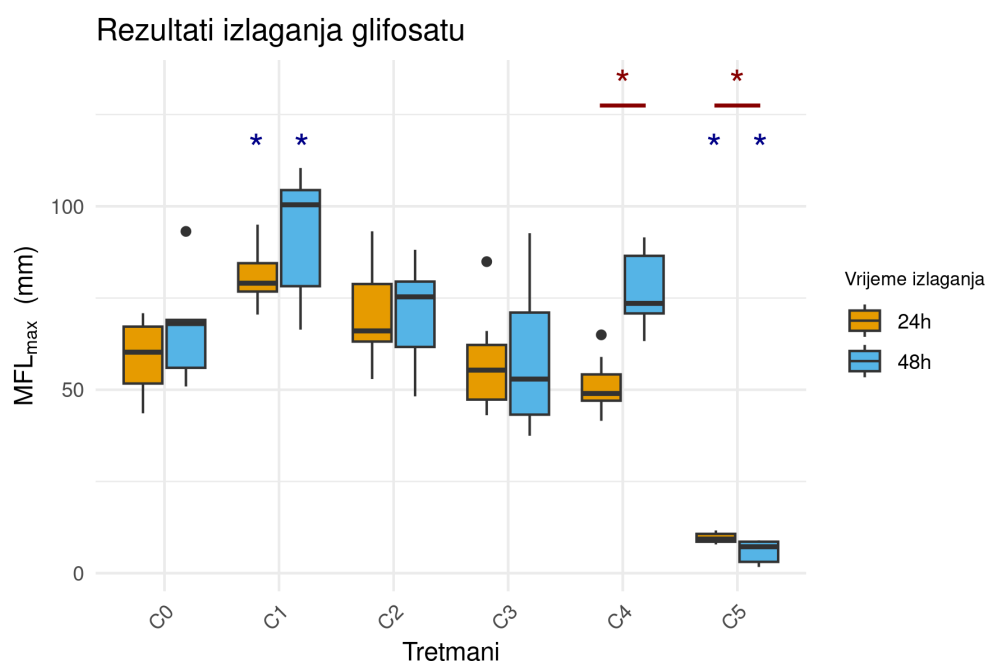
Slika 60. Utjecaj difenkonazola (TEB) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 61). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s FEN pri koncentraciji C1. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod FEN pri koncentracijama C1 i C5. Statistički značajne razlike između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C3 i C5 FEN.



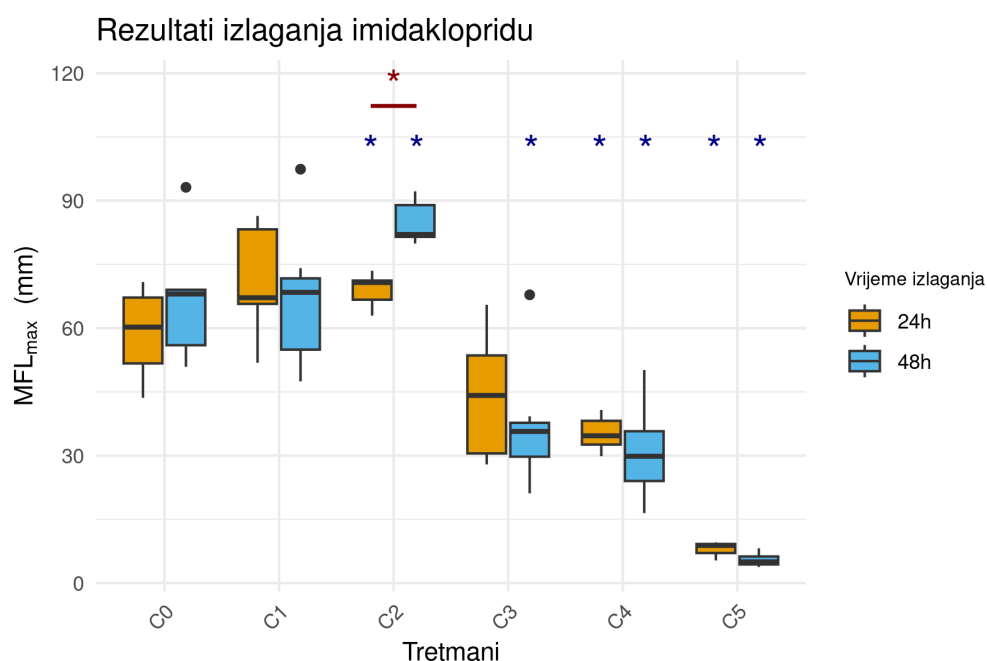
Slika 61. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 62). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C1 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod GLY pri koncentracijama C1 i C5. Statistički značajne razlike između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C4 i C5 GLY.



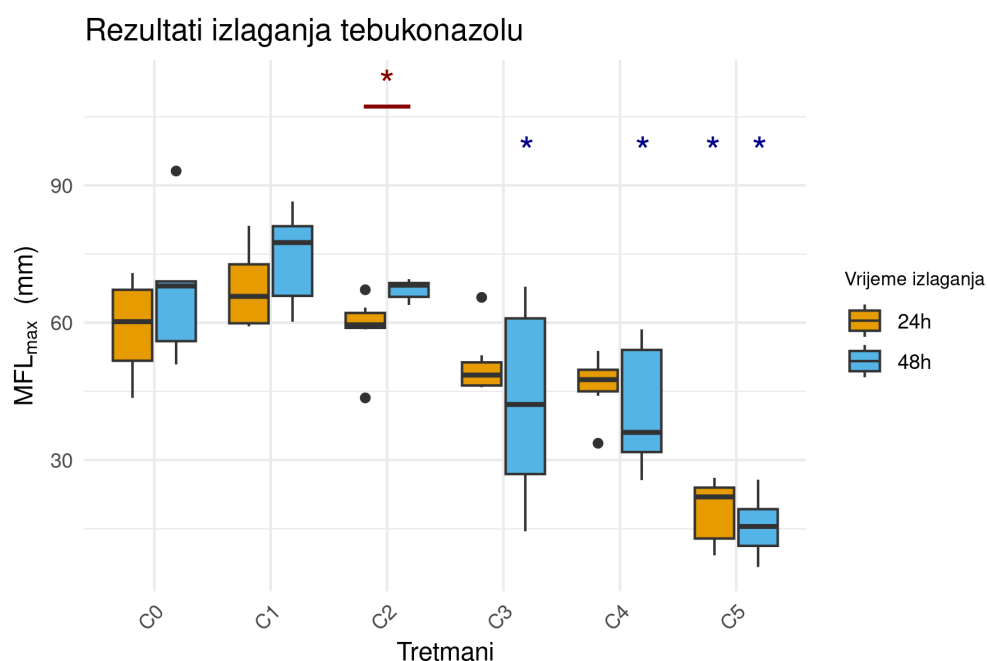
Slika 62. Utjecaj glifosata (GLY) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 63). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod IMI pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C2 IMI.



Slika 63. Utjecaj imidakloprida (IMI) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

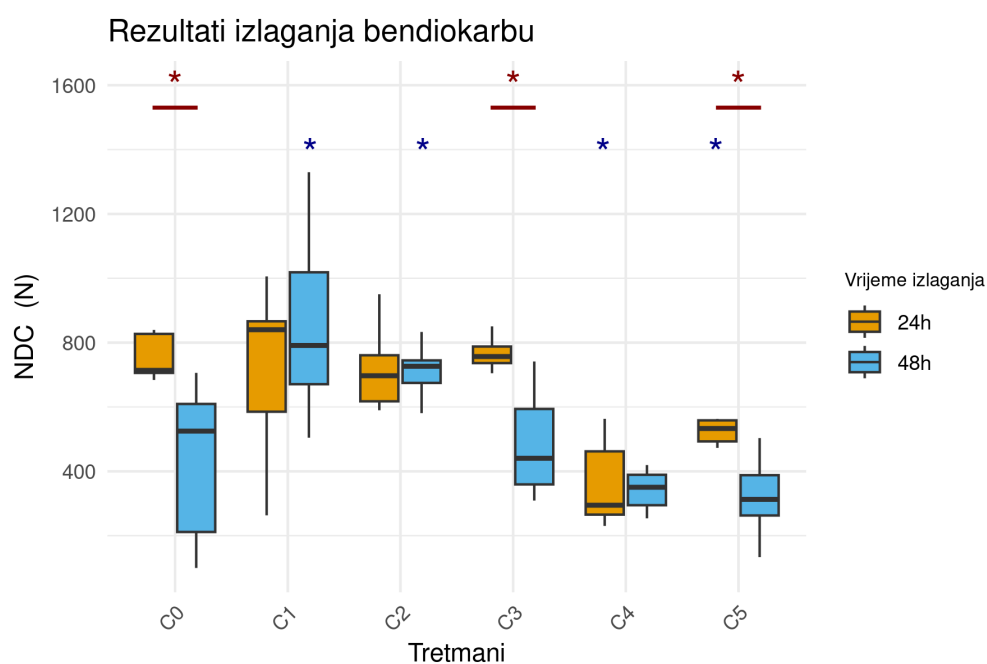
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Maksimalna duljina frakcije kretanja (MFL_{max}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 64). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, praćen silaznim trendom s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s TEB pri koncentraciji C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod TEB pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između maksimalne duljine frakcija kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C2 TEB.



Slika 64. Utjecaj tebukonazola (TEB) na maksimalnu duljinu frakcija kretanja (MFL_{max}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je maksimalna duljina frakcija kretanja izražena u milimetrima (mm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

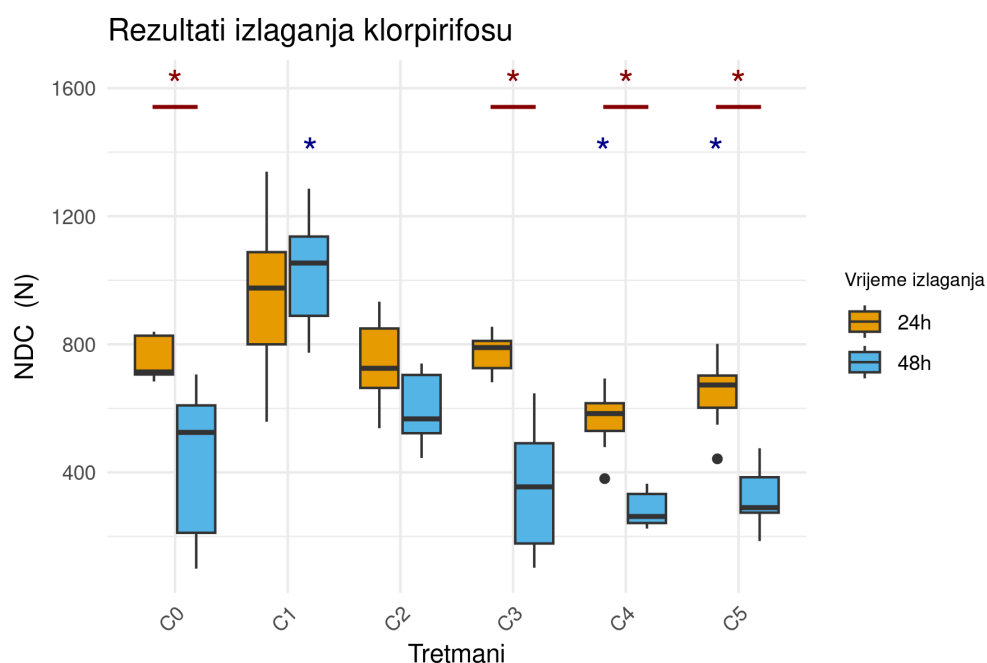
4.1.1.8. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na broj promjena smjera (NDC)

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (NDC) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 65). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C1 i C2. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C3 i C5 BDC.



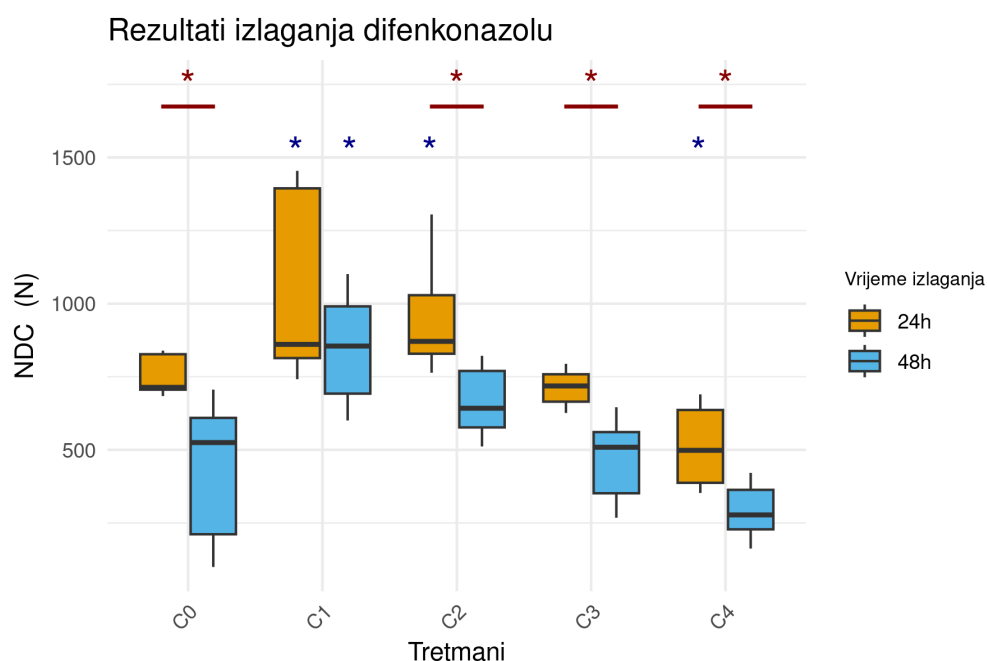
Slika 65. Utjecaj bendiokarba (BDC) na broj promjena smjera (NDC) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (NDC), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (*NDC*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 66). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je kod CHP pri koncentraciji C1. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C3, C4 i C5 CHP.



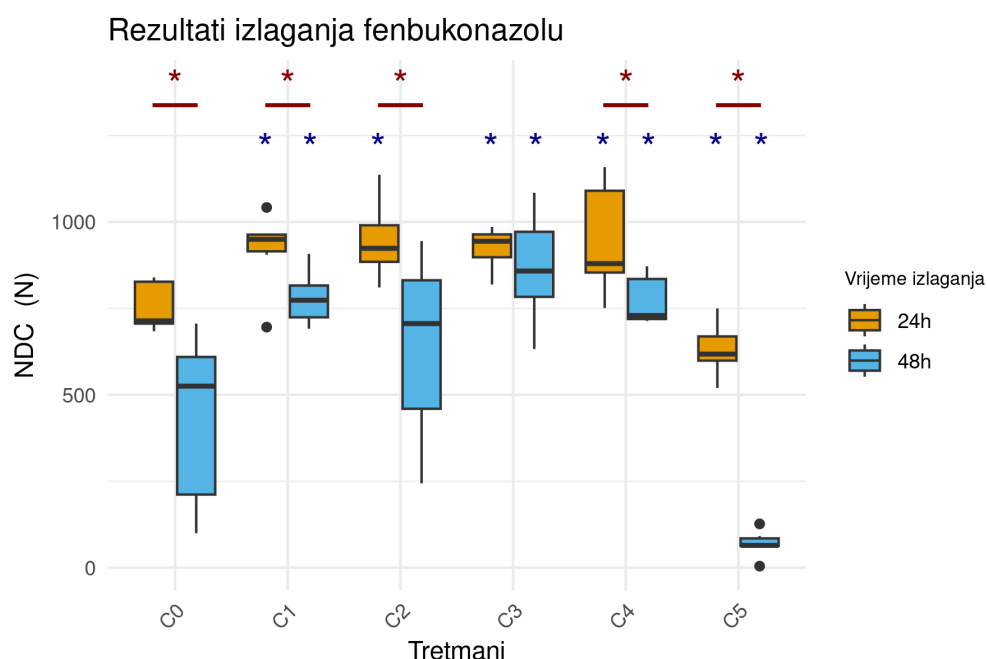
Slika 66. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na broj promjena smjera (*NDC*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (*NDC*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (*NDC*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 67). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s DIF pri koncentracijama C1, C2 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je kod DIF pri koncentraciji C1. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C2, C3 i C4 DIF.



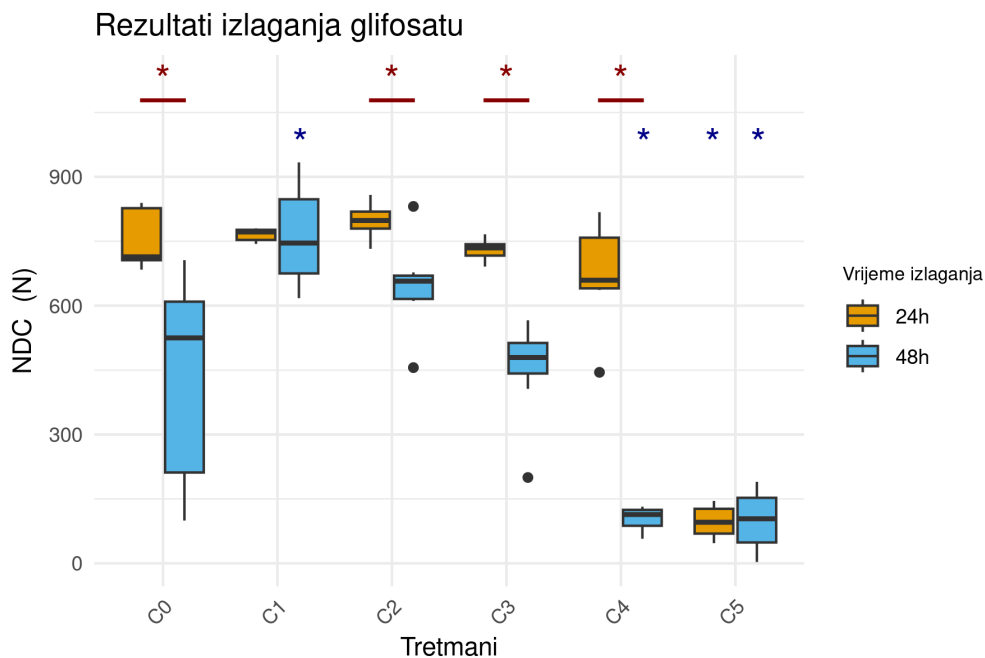
Slika 67. Utjecaj difenkonazola (DIF) na broj promjena smjera (*NDC*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (*NDC*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (*NDC*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 68). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C1, C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s FEN pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5 FEN.



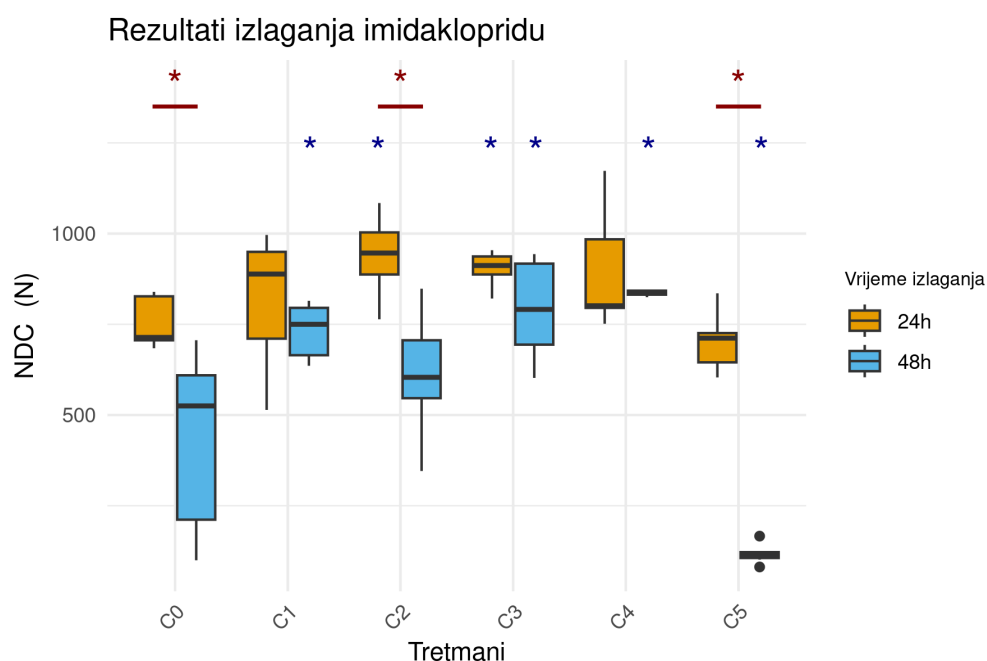
Slika 68. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na broj promjena smjera (*NDC*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (*NDC*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (*NDC*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 69). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s GLY pri koncentraciji C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C1, C4 i C5. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C2, C3 i C4 GLY.



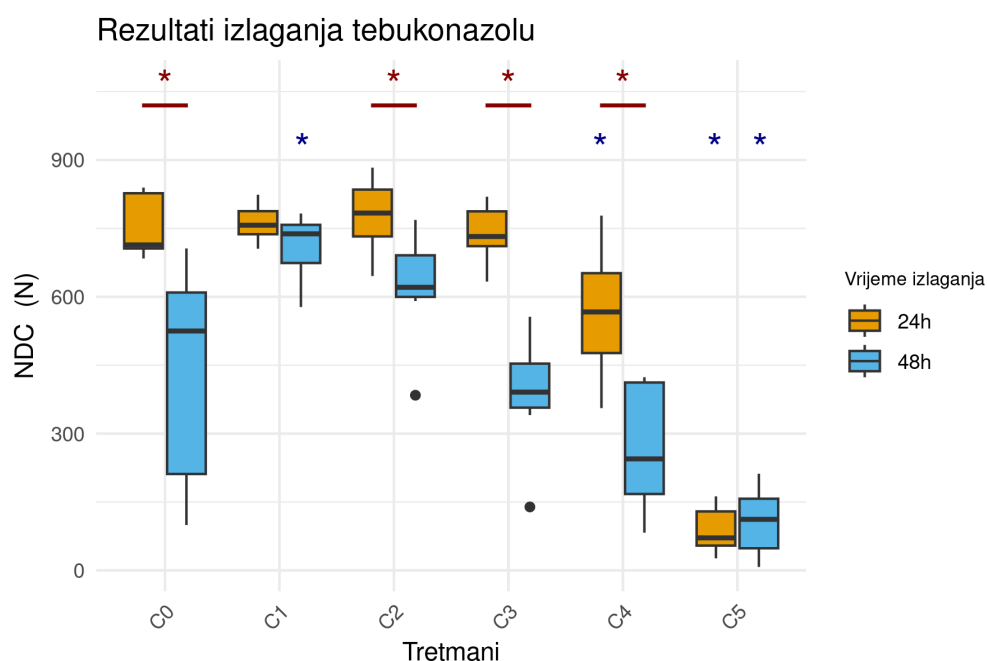
Slika 69. Utjecaj glifosata (GLY) na broj promjena smjera (*NDC*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (*NDC*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (*NDC*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 70). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C2 i C3. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C2 i C5 IMI.



Slika 70. Utjecaj imidakloprida (IMI) na broj promjena smjera (*NDC*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (*NDC*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

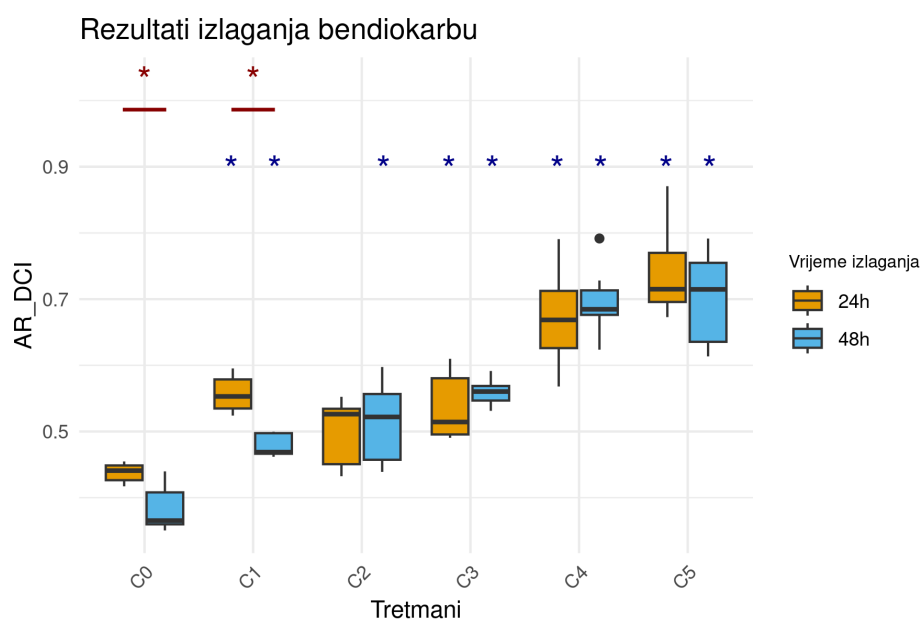
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj promjena smjera (*NDC*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 71). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je blagi porast ovog biheviorističkog elementa pri nižim koncentracijama, a potom silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s TEB pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s TEB pri koncentracijama C1 i C5. Statistički značajna razlika između broja promjene smjera nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C2, C3 i C4 TEB.



Slika 71. Utjecaj tebukonazola (TEB) na broj promjena smjera (*NDC*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj promjena smjera (*NDC*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

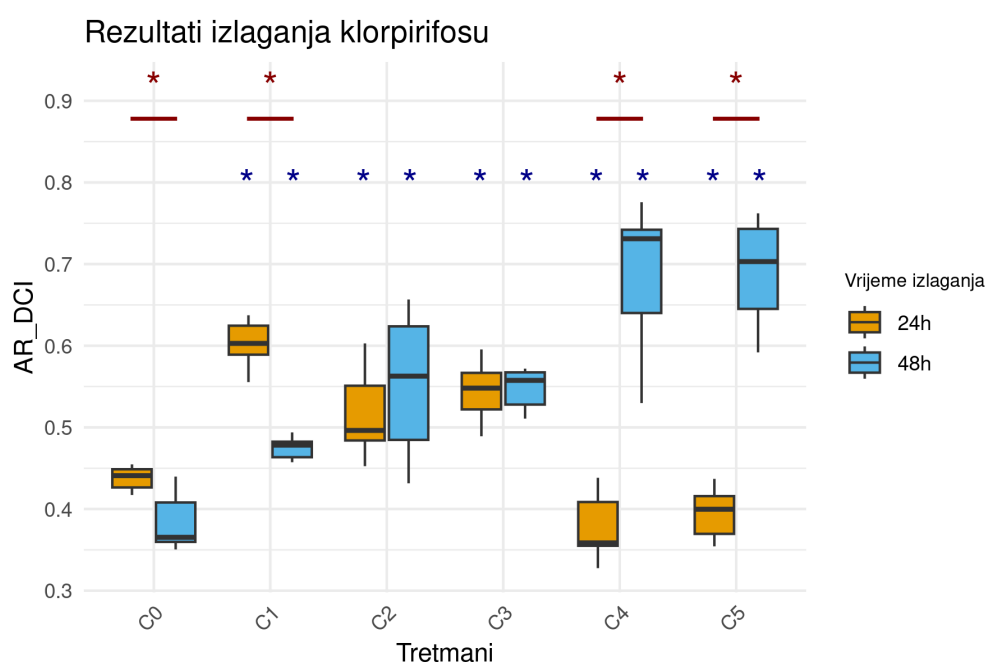
4.1.1.9. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*)

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 72). Nakon oba vremena izlaganja utvrđeno je smanjenje ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C1, C2, C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentraciji C1 BDC.



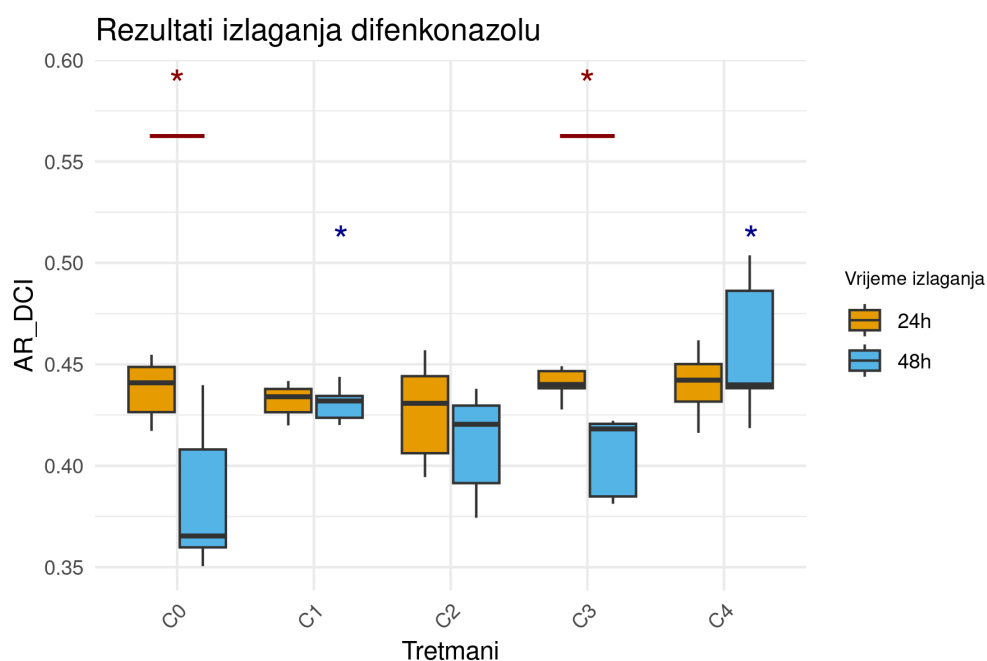
Slika 72. Utjecaj bendiokarba (BDC) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 73). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C1-C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod CHP pri koncentracijama C1-C5. Statistički značajne razlike između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentracijama C1, C4 i C5 CHP.



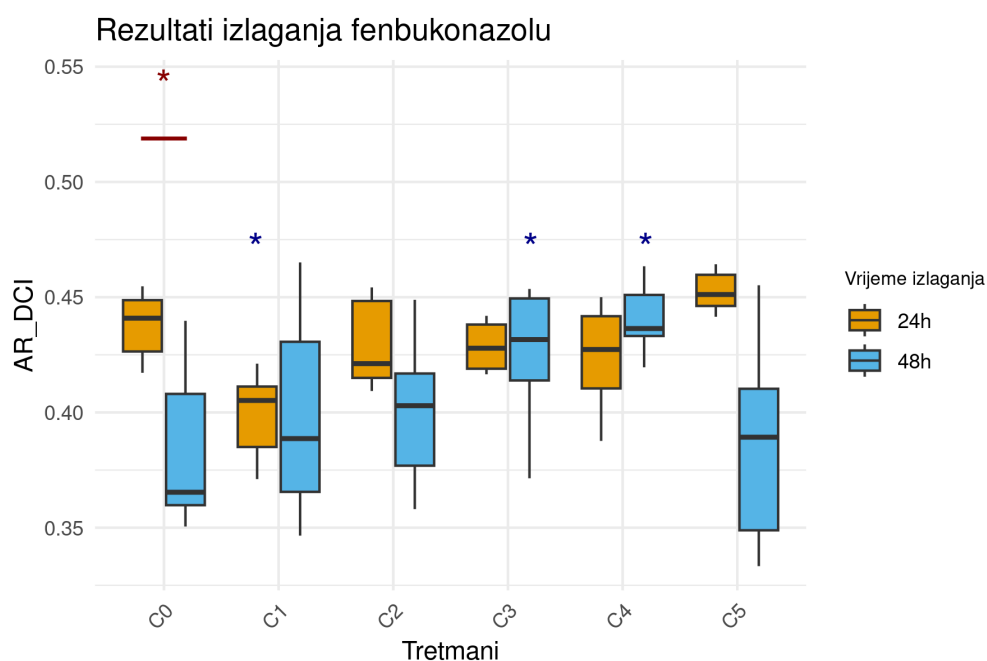
Slika 73. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 74). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu nakon 24 sata izloženosti. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod DIF pri koncentracijama C1 i C4. Statistički značajne razlike između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentraciji C3 DIF.



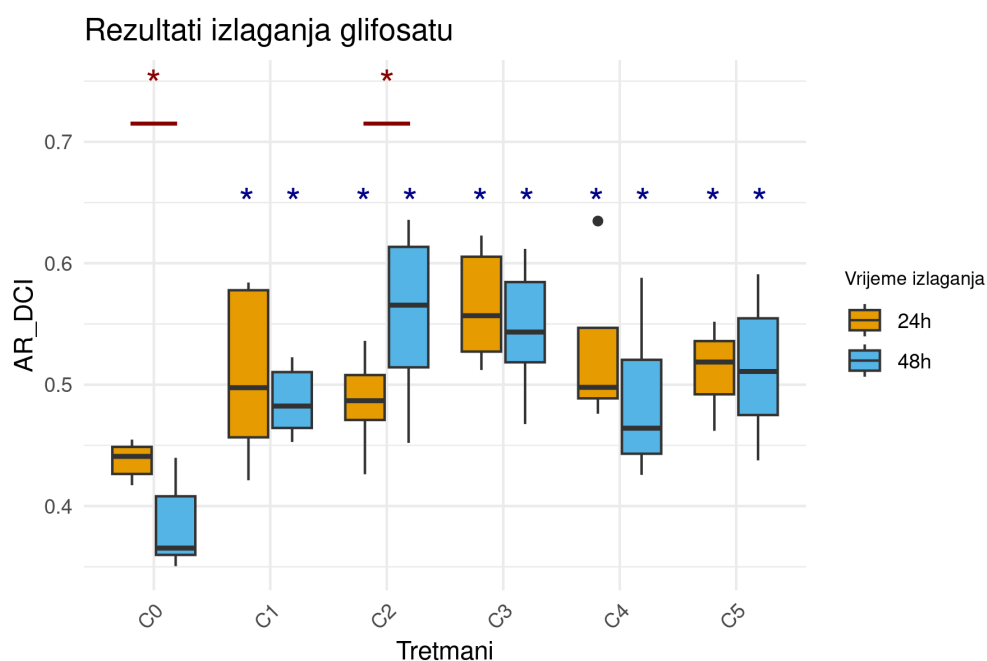
Slika 74. Utjecaj difenkonazola (DIF) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C4). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 75). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je kod FEN pri koncentraciji C1. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod FEN pri koncentracijama C3 i C4. Statistički značajne razlike između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je samo u kontrolnoj grupi.



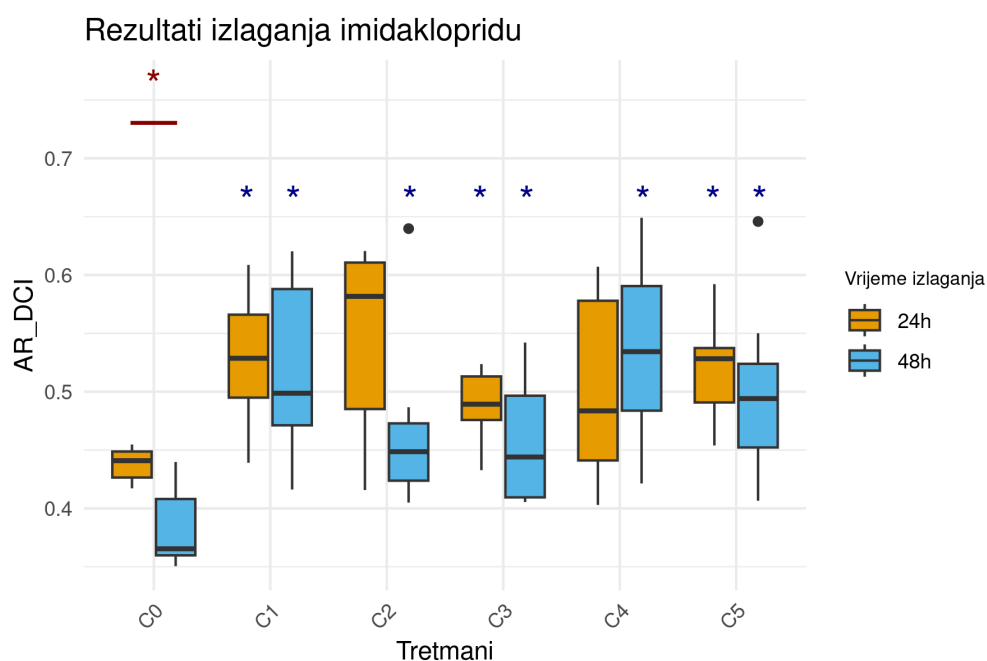
Slika 75. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 76). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C1-C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod GLY pri koncentracijama C1-C5. Statistički značajne razlike između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentraciji C2 GLY.



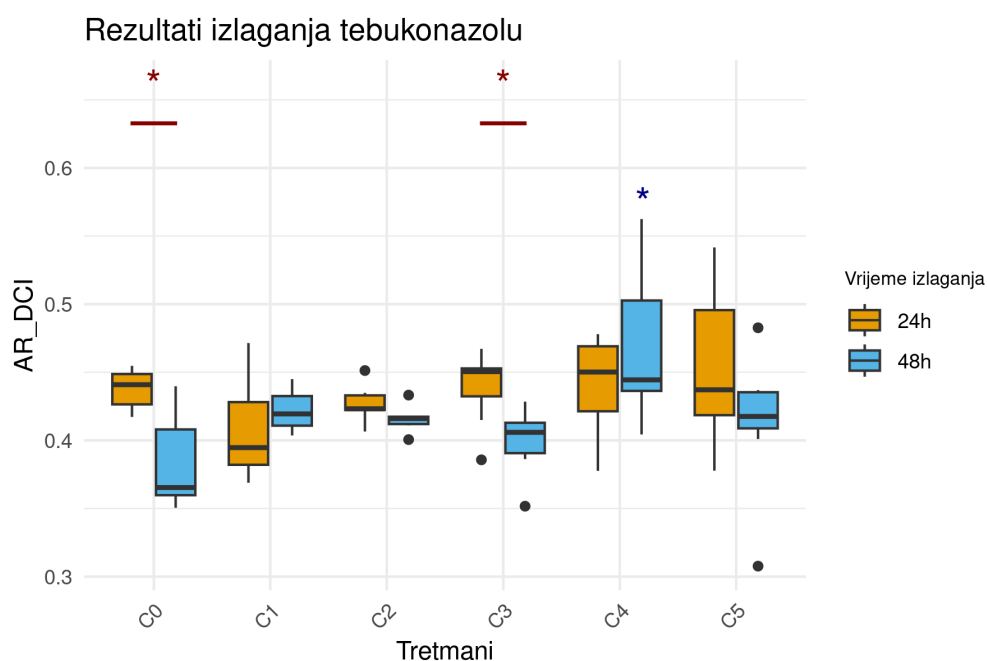
Slika 76. Utjecaj glifosata (GLY) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 77). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s IMI pri koncentracijama C1, C3 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod IMI pri koncentracijama C1-C5. Statistički značajne razlike između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je samo u kontrolnoj grupi.



Slika 77. Utjecaj imidakloprida (IMI) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

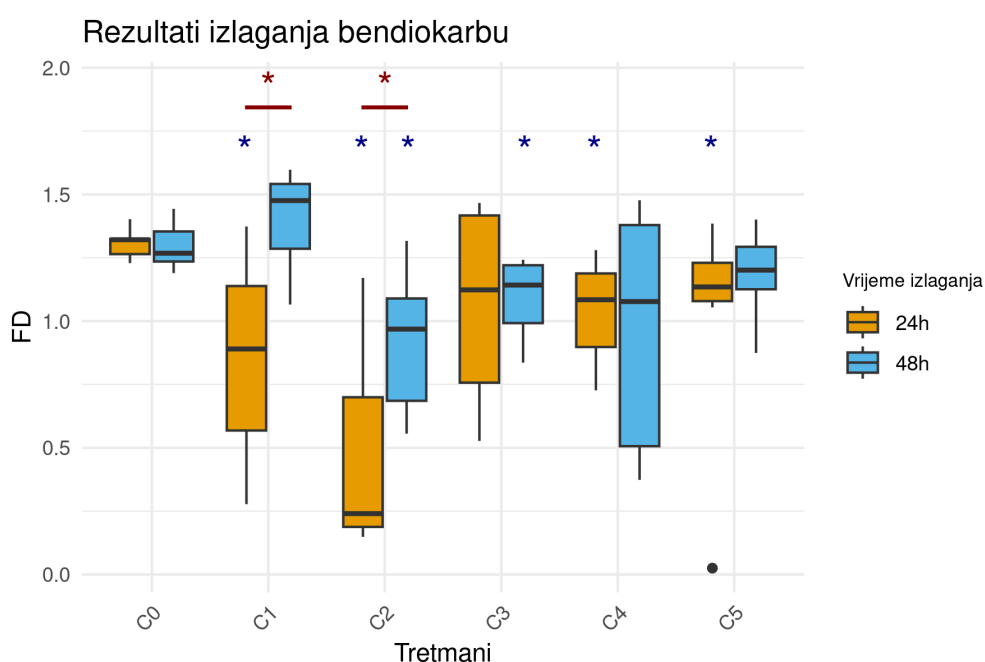
Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 78). Nakon 24 sata izloženosti, nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je pri koncentraciji C4 TEB. Statistički značajne razlike između indeksa promjene smjera nakon odmora nakon 24 sata i 48 sati opažena je u kontrolnoj grupi i pri koncentraciji C3 TEB.



Slika 78. Utjecaj tebukonazola (TEB) na indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks promjene smjera nakon odmora (*AR_DCI*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

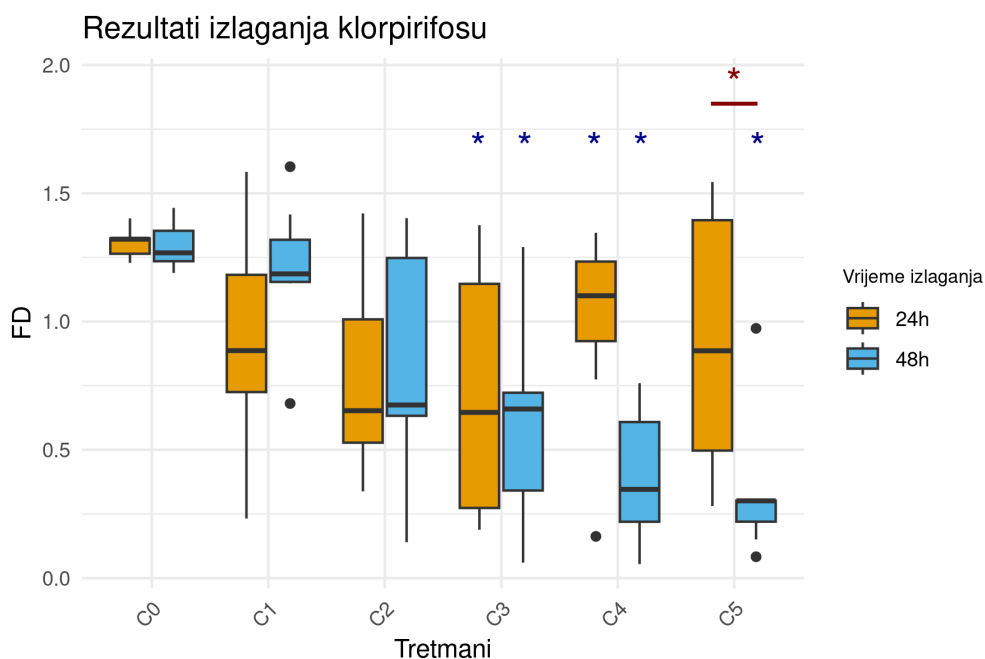
4.1.1.10. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na fraktalnu dimenziju (FD)

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (FD) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 79). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C2 i C3. Statistički značajna razlika između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentracijama C1 i C2 BDC.



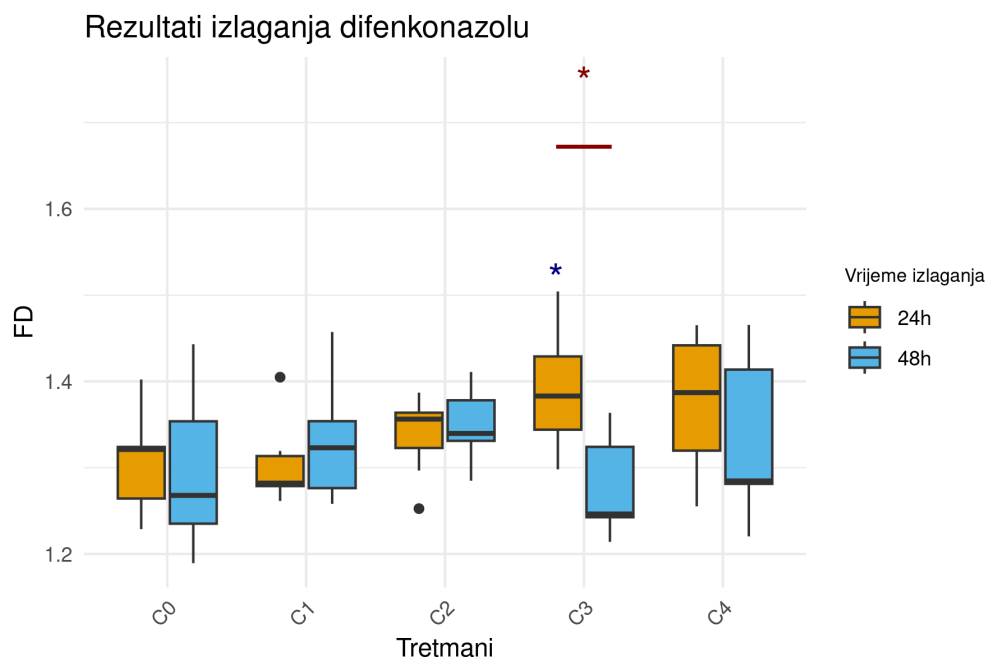
Slika 79. Utjecaj bendiokarba (BDC) na fraktalnu dimenziju (FD) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (FD), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (*FD*) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 80). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s CHP pri koncentracijama C3 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod CHP pri koncentracijama C3, C4 i C5. Statistički značajna razlika između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C5 CHP.



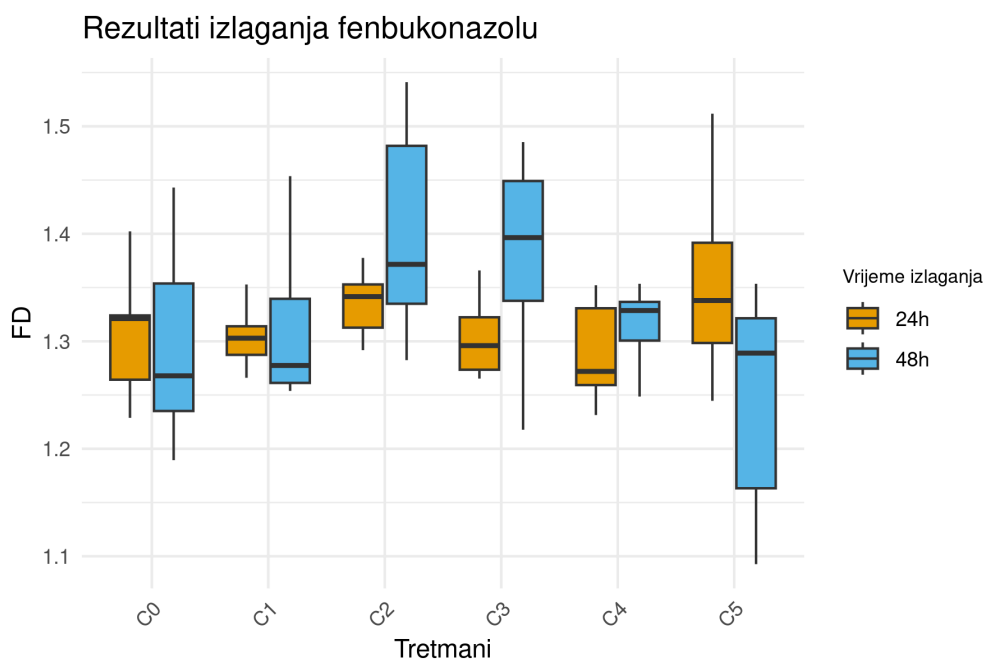
Slika 80. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na fraktalnu dimenziju (*FD*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (*FD*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (*FD*) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 81). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s DIF pri koncentraciji C3. Nakon 48 sati izloženosti, nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajna razlika između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C3 DIF.



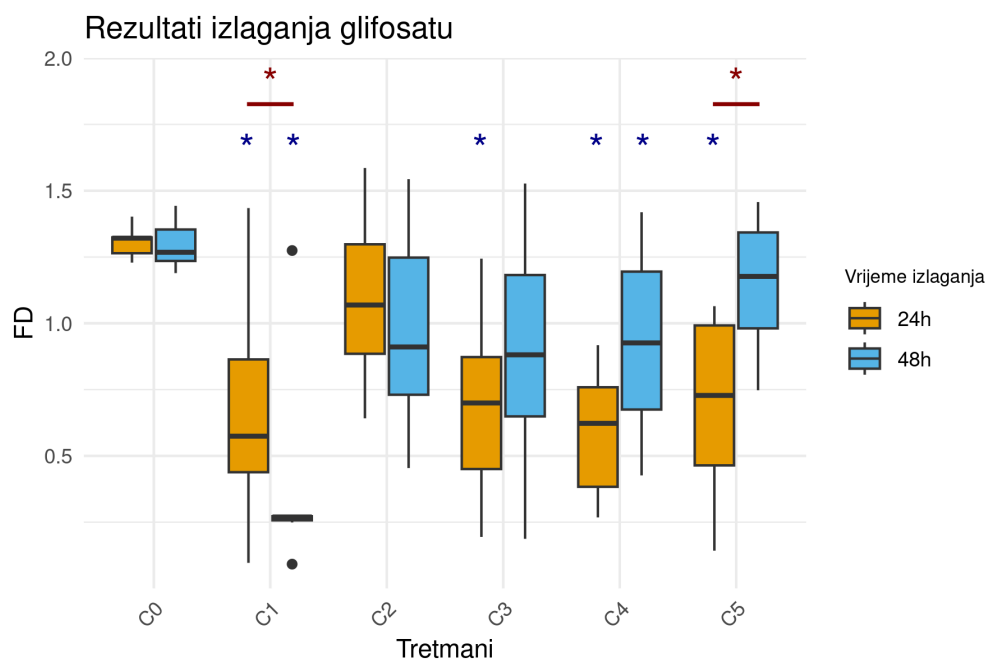
Slika 81. Utjecaj difenkonazola (DIF) na fraktalnu dimenziju (*FD*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (*FD*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C₀) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C₁-C₄). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (*FD*) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 82). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata niti 48 sati izloženosti. Također, nisu utvrđene statistički značajne razlike između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati unutar pojedinih eksperimentalnih grupa.



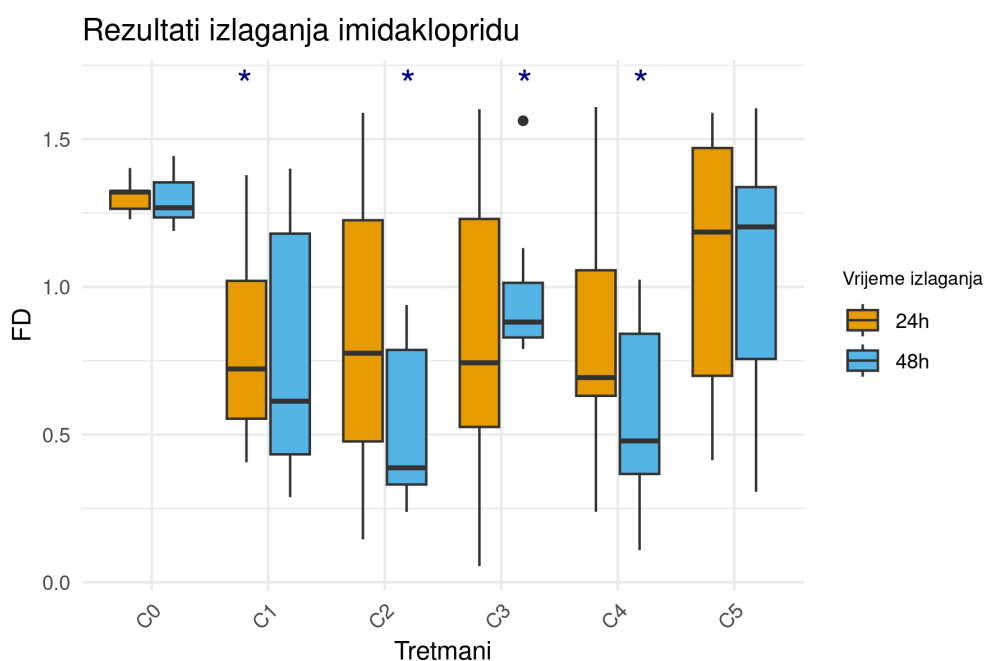
Slika 82. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na fraktalnu dimenziju (*FD*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (*FD*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosatu (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (*FD*) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 83). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s GLY pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod GLY pri koncentracijama C1 i C4. Statistički značajne razlike između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1 i C5 GLY.



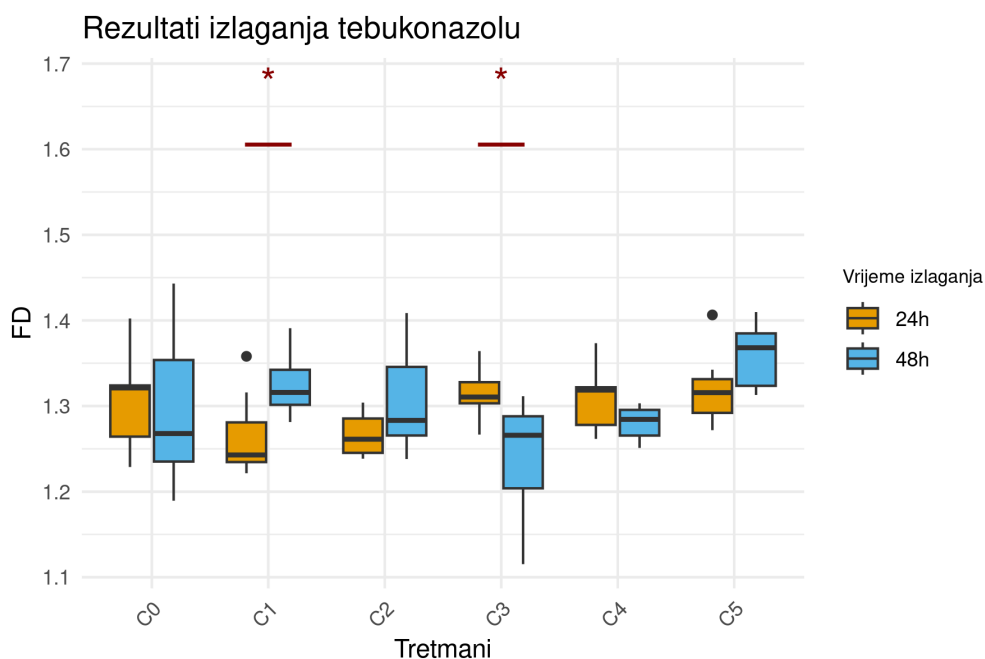
Slika 83. Utjecaj glifosata (GLY) na fraktalnu dimenziju (*FD*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (*FD*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidaklopid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (*FD*) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 84). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je kod tretmana s IMI pri koncentraciji C1. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod IMI pri koncentracijama C2, C3 i C4. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati unutar pojedinih eksperimentalnih grupa.



Slika 84. Utjecaj imidakloprida (IMI) na fraktalnu dimenziju (*FD*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (*FD*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjenjenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Vodenbuhe su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Fraktalna dimenzija (*FD*) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 85). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata niti 48 sati izloženosti. Statistički značajne razlike između fraktalne dimenzije nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1 i C3 TEB.



Slika 85. Utjecaj tebukonazola (TEB) na fraktalnu dimenziju (*FD*) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je fraktalna dimenzija (*FD*), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

4.1.2. Rezultati analize ovisnosti biheviorističkih elemenata o koncentraciji zagađivala

4.1.2.1. Rezultati prilagodbe krivulja ovisnosti o dozi rezultatima nakon 24-satne izloženosti organizama zagađivalima

Rezultati prilagodbe krivulja ovisnosti o dozi za različite biheviorističke parametre vodenbuha, nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala, prikazani su u odgovarajućim tablicama (Tablice 4-10). Tablice 4-10 sadrže statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje, uz intervale povjerenja (CI) i p-vrijednosti za svaki tretman i bihevioristički parametar. Rezultati prikazani u Tablici 11 s EC50 vrijednostima za srednju brzinu plivanja (v_{av}), korišteni su kao osnova za dizajn eksperimenata s binarnim mješavinama zagađivala s obzirom kako se srednja brzina plivanja najčešće mjeri kao temeljni bihevioristički element u istraživanjima.

Tablica 4. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja bendiokarba (BDC) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervale pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	0,0157 (0,0102 - 0,0212)	1,0264e-06
v_{frac}	0,0211 (0,0033 - 0,0388)	0,002105
MFL_{max}	0,0246 (0,0113 - 0,0378)	5,613e-04
MFL_{av}	0,0374 (0,008 - 0,0668)	0,001409
MI	0,0864 (0,027 - 0,1458)	0,0005442

Tablica 5. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja klorpirifosa (CHP) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervale pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{frac}	0,1559 (0,0019 - 0,3099)	0,0473
v_{av}	0,1967 (0,0815 - 0,3119)	0,0013
MFL_{max}	0,7488 (0,291 - 1,2066)	0,0020
NDC	8,8593 (1,2403 - 16,4782)	0,0238

Tablica 6. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja difenkonazola (DIF) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	0,9524 (0,4398 - 1,465)	0,000639
MI	1,7049 (0,4381 - 2,9717)	0,0099

Tablica 7. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja fenbukonazola (FEN) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	5,1719 (3,7844 - 6,5594)	4,5456e-09
MFL_{av}	5,7208 (2,7211 - 8,7205)	0,0004258
NDC	5,8458 (0,5253 - 11,1664)	0,0032148

Tablica 8. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja glifosata (GLY) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	11,3453 (10,3319 - 12,3587)	< 2,2e-16
MFL_{max}	11,7288 (10,5914 - 12,8662)	< 2,2e-16
NDC	12,3134 (11,7423 - 12,8846)	< 2,2e-16
MI	12,9199 (12,1873 - 13,6524)	< 2,2e-16
MFL_{av}	13,2821 (9,6022 - 16,962)	8,3134e-09
v_{max}	14,7647 (13,4482 - 16,0812)	< 2,2e-16

Tablica 9. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja imidakloprida (IMI) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	356,8361 (257,2428 - 456,4293)	9,8339e-09
MFL_{av}	379,9652 (255,3895 - 504,5409)	3,0131e-07
MFL_{max}	405,2729 (315,6449 - 494,901)	3,0106e-11

Tablica 10. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja tebukonazola (TEB) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	24 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
NDC	1,7448 (1,3771 - 2,1126)	8,1020e-12
MI	2,5120 (1,7513 - 3,2727)	5,9254e-08
MFL_{max}	2,5686 (1,5 - 3,6372)	1,9331e-05
v_{av}	3,0907 (0,0425 - 6,1389)	0,0047042
MFL_{av}	4,5141 (3,0857 - 5,9424)	1,4775e-07
v_{frac}	6,0963 (3,4753 - 8,7173)	3,1660e-05

Tablica 11. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za bihevioristički element v_{av} dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja svih pesticida na bihevioristički element v_{av} nakon 24-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Pesticid	24 h EC50 v_{av} i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
Bendiokarb (BDC)	0,0157 (0,0102 - 0,0212)	1,0264e-06
Klorpirifos (CHP)	0,1967 (0,0815 - 0,3119)	0,0013
Difenkonazol (DIF)	0,9524 (0,4398 - 1,465)	0,000639
Fenbukonazol (FEN)	5,1719 (3,7844 - 6,5594)	4,5456e-09
Glifosat (GLY)	11,3453 (10,3319 - 12,3587)	< 2,2e-16
Imidakloprid (IMI)	356,8361 (257,2428 - 456,4293)	9,8339e-09
Tebukonazol (TEB)	3,0907 (0,0425 - 6,1389)	0,0047042

4.1.2.2. Rezultati prilagodbe krivulja ovisnosti o dozi rezultatima nakon 48-satne izloženosti organizama zagađivalima

Rezultati prilagodbe krivulja ovisnosti o dozi za različite biheviorističke parametre vodenbuha, nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala, prikazani su u odgovarajućim tablicama (Tablice 12-18). Tablice 12-18 sadrže statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje, uz intervale povjerenja (CI) i p-vrijednosti za svaki tretman i bihevioristički parametar.

Tablica 12. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja bendiokarba (BDC) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervale pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	0,0057 (0,002 - 0,0094)	0,0003362
MFL_{max}	0,0146 (0,0102 - 0,0189)	3,91069e-08
MFL_{av}	0,0256 (0,019 - 0,0323)	1,89534e-09
NDC	0,0348 (0,0066 - 0,063)	0,0168872
MI	0,0407 (0,0069 - 0,0745)	0,0194955

Tablica 13. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja klorpirifosa (CHP) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervale pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
MFL_{max}	0,1747 (0,0575 - 0,2918)	0,0045
MFL_{av}	0,8732 (0,4483 - 1,2981)	0,0002

Tablica 14. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja difenkonazola (DIF) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervale pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	0,3256 (0,0272 - 0,6241)	0,0334
MFL_{max}	1,1624 (0,4201 - 1,9046)	0,0032

Tablica 15. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja fenbukonazola (FEN) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{av}	1,9538 (0,9251 - 2,9826)	0,0004
MFL_{max}	2,9457 (1,4083 - 4,4831)	0,0004

Tablica 16. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja glifosata (GLY) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
MI	5,8379 (4,0553 - 7,6205)	7,0608e-08
NDC	6,7416 (5,0156 - 8,4676)	1,2859e-09
v_{max}	7,3559 (5,1106 - 9,6011)	7,0017e-08
MFL_{max}	13,7229 (7,4956 - 19,9503)	6,8205e-05

Tablica 17. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja imidakloprida (IMI) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
MFL_{max}	302,1181 (213,8079 - 390,4283)	2,7617e-08
MFL_{av}	349,0578 (218,2961 - 479,8196)	3,5281e-06
MI	694,4818 (599,9137 - 789,0498)	< 2,2e-16
NDC	703,5247 (563,3644 - 843,6851)	1,6627e-12

Tablica 18. Statistički značajne EC50 vrijednosti ($p < 0,05$) za biheviorističke elemente dobivene prilagodbom 3-parametarske log-logističke krivulje rezultatima utjecaja tebukonazola (TEB) na biheviorističke elemente vodenbuha nakon 48-satne izloženosti različitim razrjeđenjima zagađivala. Uz EC50 vrijednosti naznačene su i intervali pouzdanosti (CI) i p-vrijednosti.

Bihevioristički element	48 h EC50 i 95% CI (mg L ⁻¹)	p-vrijednost
v_{max}	2,3976 (0,7298 - 4,0654)	0,00598
MFL_{av}	5,5534 (3,3235 - 7,7832)	1,1124e-05

4.1.3. Rezultati eksperimenata s binarnim mješavinama pesticida

Većina binarnih mješavina pokazala je aditivne učinke, pri čemu je kombinirani učinak pesticida bio jednak zbroju njihovih pojedinačnih učinaka ($CI=1$; $p>0,05$). Sinergističke interakcije, pri kojima je kombinirani učinak bio veći od zbroja pojedinačnih učinaka ($CI<1$; $p<0,05$), opažene su u mješavinama koje su uključivale CHP s BDC i IMI pri svim omjerima mješavina. Slično tome, neki omjeri mješavina GLY s BDC i IMI, kao i BDC s IMI, također su pokazali sinergističke učinke (Tablica 19).

Tablica 19. Vrijednosti indeksa kombinacije (CI) te njihovi intervali pouzdanosti (95%) za različite omjere binarnih mješavina zagađivala. Prikazana je vrsta interakcije (aditivna ili sinergistička) za svaki omjer komponenti mješavina na temelju testiranja hipoteze $H_0: CI = 1$.

Mješavina	Omjer komponenti mješavine	Indeks kombinacije (CI) temeljen na EC50 i 95%-tni interval pouzdanosti CI	p-vrijednost ($H_0: CI=1$)	Tip interakcije
CHP x GLY	25:75	1,0175 (0,6935- 1,3414)	0,9158	aditivini
	50:50	0,9553 (0,7379- 1,1726)	0,6869	aditivini
	75:25	1,0571 (0,8668- 1,2474)	0,5567	aditivini
CHP x BDC	25:75	0,6290 (0,3513-0,9067)	0,0088	sinergistički
	50:50	0,4062 (0,0614-0,7509)	0,0007	sinergistički
	75:25	0,6016 (0,3296-0,8736)	0,0041	sinergistički
CHP x IMI	25:75	0,5846 (0,2653-0,9039)	0,0108	sinergistički
	50:50	0,3438 (0,0868-0,6009)	6e-07	sinergistički
	75:25	0,3943 (0,0368-0,7517)	0,0009	sinergistički
CHP x TEB	25:75	0,9930 (0,6704- 1,3157)	0,9662	aditivini
	50:50	0,9657 (0,7125- 1,2188)	0,7903	aditivini
	75:25	1,0741 (0,8153- 1,3329)	0,5749	aditivini
CHP x DIF	25:75	1,0425 (0,6761- 1,4088)	0,8203	aditivini
	50:50	0,9883 (0,1906-1,7860)	0,9770	aditivini
	75:25	1,0898 (0,5808-1,5989)	0,7294	aditivini
CHP x FEN	25:75	0,9250 (0,6025- 1,2474)	0,6483	aditivini
	50:50	1,0239 (0,6566-1,3913)	0,8984	aditivini
	75:25	1,0795 (0,5879-1,5712)	0,7512	aditivini

Tablica 19. Nastavak.

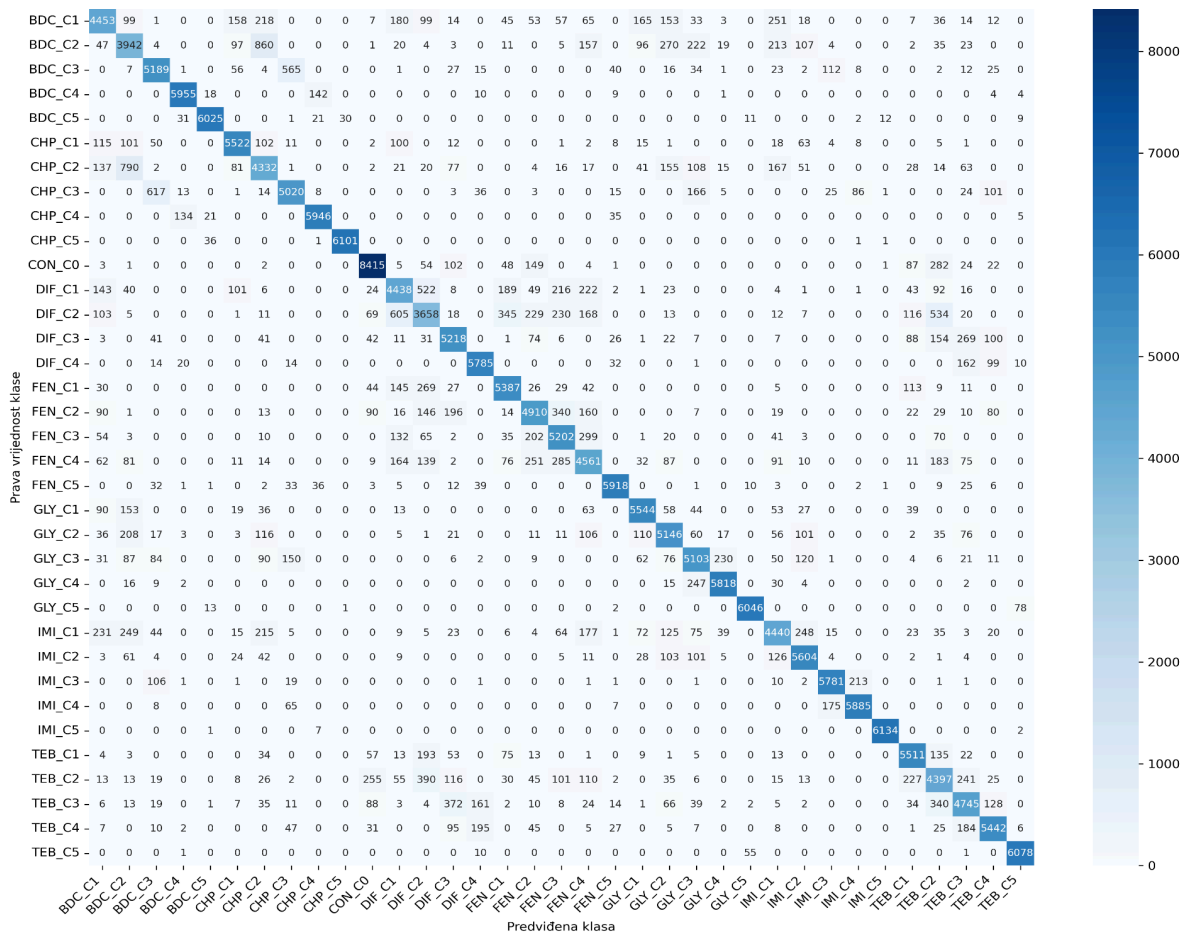
Mješavina	Omjer komponenti mješavine	Indeks kombinacije (CI) temeljen na EC50 i 95%-tni interval pouzdanosti CI	p-vrijednost (H ₀ : CI=1)	Tip interakcije
GLY x BDC	25:75	0,8033 (0,5612-1,0454)	0,1113	aditivini
	50:50	0,4384 (0,0556-0,9325)	0,0259	sinergistički
	75:25	0,2917 (0,0281-0,5553)	1e-07	sinergistički
GLY x IMI	25:75	0,4142 (0,1221- 0,1749)	1,6e-06	sinergistički
	50:50	0,6640 (0,1046-1,2235)	0,2392	aditivini
	75:25	0,4879 (0,1769-0,7990)	0,0013	sinergistički
GLY x TEB	25:75	0,9979 (0,8362- 1,1597)	0,9798	aditivini
	50:50	0,9982 (0,8238- 1,1727)	0,9845	aditivini
	75:25	1,0798 (0,8540- 1,3056)	0,4884	aditivini
GLY x DIF	25:75	0,9503 (0,7800-1,1206)	0,5671	aditivini
	50:50	0,9411 (0,6663- 1,2158)	0,6742	aditivini
	75:25	1,1997 (0,6073-1,7922)	0,5088	aditivini
GLY x FEN	25:75	0,9839 (0,7883- 1,1795)	0,8717	aditivini
	50:50	1,0727 (0,7480-1,3975)	0,6607	aditivini
	75:25	1,0970 (0,6273-1,5666)	0,6858	aditivini
BDC x IMI	25:75	0,6007 (0,1551-1,0464)	0,0791	aditivini
	50:50	0,5500 (0,1628-0,9371)	0,0227	sinergistički
	75:25	0,3955 (0,0816-0,7094)	0,0002	sinergistički
BDC x TEB	25:75	1,0663 (0,7483-1,3844)	0,6828	aditivini
	50:50	1,0249 (0,7739-1,2760)	0,8456	aditivini
	75:25	0,9988 (0,7431-1,2545)	0,9930	aditivini
BDC x DIF	25:75	0,9828 (0,6822-1,2834)	0,9108	aditivini
	50:50	0,9573 (0,6382-1,2764)	0,7931	aditivini
	75:25	1,0263 (0,5678-1,4849)	0,9104	aditivini

Tablica 19. Nastavak.

Mješavina	Omjer komponenti mješavine	Indeks kombinacije (CI) temeljen na EC50 i 95%-tni interval pouzdanosti CI	p-vrijednost (H ₀ : CI=1)	Tip interakcije
BDC x FEN	25:75	1,0002 (0,6698-1,3307)	0,9989	aditivini
	50:50	1,0321 (0,6675- 1,3967)	0,8630	aditivini
	75:25	1,0405 (0,5514-1,5296)	0,8711	aditivini
IMI x TEB	25:75	1,0399 (0,6221-1,4577)	0,8514	aditivini
	50:50	0,9895 (0,6889-1,2901)	0,9454	aditivini
	75:25	1,0850 (0,8164-1,3536)	0,5353	aditivini
IMI x DIF	25:75	0,9623 (0,5724-1,3521)	0,8496	aditivini
	50:50	0,9609 (0,6040-1,3179)	0,8301	aditivini
	75:25	1,0606 (0,5729-1,5482)	0,8077	aditivini
IMI x FEN	25:75	1,0313 (0,6041-1,4585)	0,8858	aditivini
	50:50	1,0104 (0,6123-1,4087)	0,9589	aditivini
	75:25	1,0857 (0,5982-1,5733)	0,7303	aditivini
TEB x DIF	25:75	0,9450 (0,7448- 1,1452)	0,5901	aditivini
	50:50	0,9524 (0,6474- 1,2574)	0,7596	aditivini
	75:25	0,9598 (0,5292- 1,3904)	0,8548	aditivini
TEB x FEN	25:75	1,0257 (0,7713- 1,2800)	0,8433	aditivini
	50:50	1,0180 (0,6918- 1,3441)	0,9140	aditivini
	75:25	1,0502 (0,5812- 1,5192)	0,8339	aditivini
DIF x FEN	25:75	0,9398 (0,4556- 1,4241)	0,8076	aditivini
	50:50	0,9377 (0,5014- 1,3741)	0,7796	aditivini
	75:25	0,9248 (0,4555- 1,3942)	0,7536	aditivini

4.1.4. Detekcija izloženosti organizama zagađivalima primjenom dubokog učenja

U ovom potpoglavlju prikazani su rezultati performanse umjetne neuronske mreže (ANN) razvijene za detekciju izloženosti organizama zagađivalima temeljem ulaznih podataka dobivenih eksperimentalnim mjerenjima. Na Slici 86 je prikazana zbirna matrica zabune (eng. *confusion matrix*) dobivena kao zbroj svih pojedinačnih matrica zabune tijekom 50 iteracija procesa učenja ANN. Na x-osi prikazane su klase koje je model predvidio, dok su na y-osi prikazane stvarne vrijednosti klasa. Intenzitet boje unutar kvadranta matrice odražava broj pogodaka ili pogrešnih klasifikacija – što je intenzitet obojenja viši (tamnija plava boja), to je veća učestalost određene kombinacije predviđene i stvarne klase, odnosno to je veća točnost predikcije ANN za određenu klasu.



Slika 86. Zbirna matrica zabune (eng. *confusion matrix*) dobivena kao zbroj matrica zabune dobivenih u svim koracima iteracije učenja neuronske mreže (N=50). Na x-osi navedene su klase predviđene neuronskom mrežom, dok su na y-osi oznake pravih vrijednosti klasa.

Intenzitet obojenja kvadranta matrice odgovara vrijednosti unutar kvadranta.

Dijagonala matrice zabune (Slika 85) prikazuje točne klasifikacije, gdje model ispravno predviđa pripadnost uzorka odgovarajućoj klasi. Većina klasa pokazuje visoke vrijednosti na dijagonali, što ukazuje na općenitu uspješnost modela u razlikovanju uzoraka. Elementi izvan dijagonale predstavljaju pogrešne klasifikacije. Analiza vrijednosti pokazuje kako je mogućnost predviđanja najslabije za klasu DIF_C2, a koja najčešće biva zamijenjena s DIF_C1, TEB_C2 te drugim klasama koje označavaju niske koncentracije drugih zagađivala. Određene klase, kao što su kontrola (CON_C0), IMI_C5, CHP_C5 i dr., imaju izuzetno visoke vrijednosti točnih klasifikacija, što sugerira mogućnost pouzdanog razlikovanja ovih uzoraka od ostalih. Vidljive su pogrešne zamjene između podklasa poput uzoraka iz tretmana s FEN, TEB i sl., što može upućivati na preklapanje karakteristika uzoraka unutar tih kategorija.

Ključne metrike proizašle iz analize performansi ANN temeljene na 50 iteracija prikazane su u Tablici 20.

Tablica 20. Sažetak metrika procjene performansi ANN. Tablica prikazuje osnovne statistike (prosjeck, standardnu devijaciju, minimum, maksimum, i kvartile) za vrijednosti metrika performansi ANN izračunate na temelju 50 iteracija. Analizirane metrike obuhvaćaju točnost, uravnoteženu točnost, makro F1 rezultat, prosječnu preciznost, osjetljivost i specifičnost.

Stat.	Točnost	Uravnotežena točnost	Makro F1 rezultat	Prosječna preciznost	Prosječna osjetljivost	Prosječna specifičnost
SV	34,7216	0,928	0,8592	0,8622	0,86	0,9959
SD	0,0126	0,0033	0,0063	0,0058	0,0064	0,0002
min	34,6959	0,9213	0,8457	0,8487	0,8471	0,9955
25%	34,7139	0,9258	0,8548	0,8594	0,8558	0,9958
50%	34,7222	0,9281	0,8593	0,8624	0,8602	0,9959
75%	34,7303	0,9302	0,8635	0,8662	0,8645	0,996
max	34,7454	0,9344	0,8722	0,8745	0,8725	0,9963

Prosječna točnost modela iznosi 34,72%, dok prosječna uravnotežena točnost iznosi 92,80%, što ukazuje na visoku sposobnost modela u pravilnom klasificiranju različitih klasa, čak i kod neuravnoteženih podataka. Makro F1 rezultat (prosjeck F1 rezultata za sve klase) iznosi 85,92%, što odražava uravnoteženost između preciznosti i osjetljivosti. Prosječna preciznost modela iznosi 86,22%, dok prosječna osjetljivost iznosi 86,00%. Ove vrijednosti ukazuju na pouzdano prepoznavanje pozitivnih primjera, uz minimalan broj pogrešno predviđenih

pozitivnih i negativnih primjera. Specifičnost modela, koja pokazuje sposobnost pravilnog prepoznavanja negativnih primjera, izuzetno je visoka (99.59%). Standardne devijacije vrijednosti svih metrika su niske, što ukazuje na stabilnost izvedbe ANN tijekom iteracija. Ovi rezultati ukazuju na konzistentne performanse s visokom razinom točnosti i uravnoteženosti između klasa.

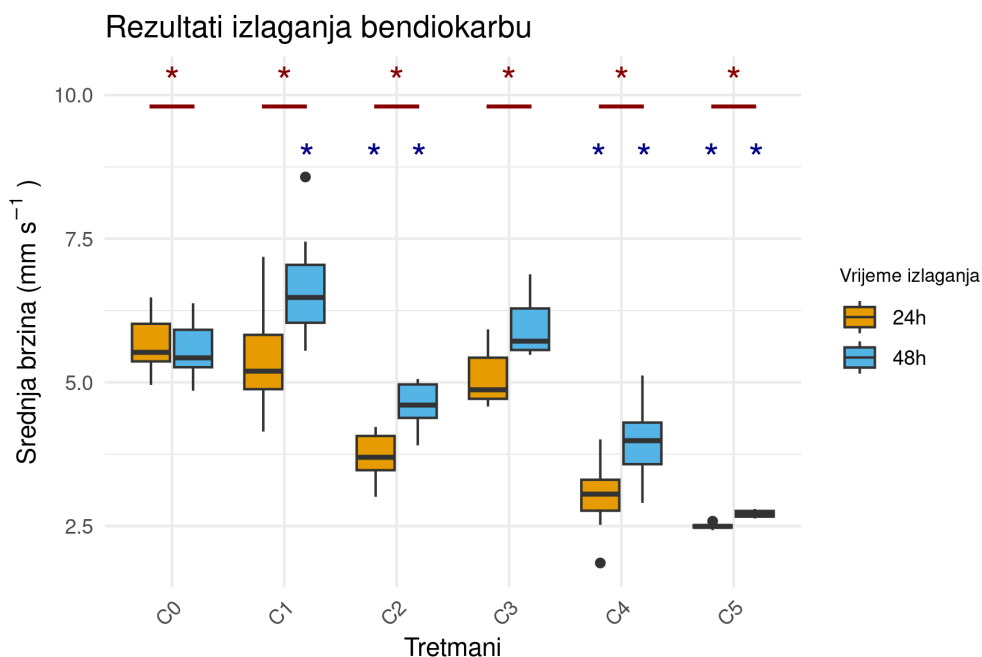
4.2. Učinak zagađivala na biheviorističke elemente gujavica

4.2.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na biheviorističke elemente gujavica u okviru filter papir testa

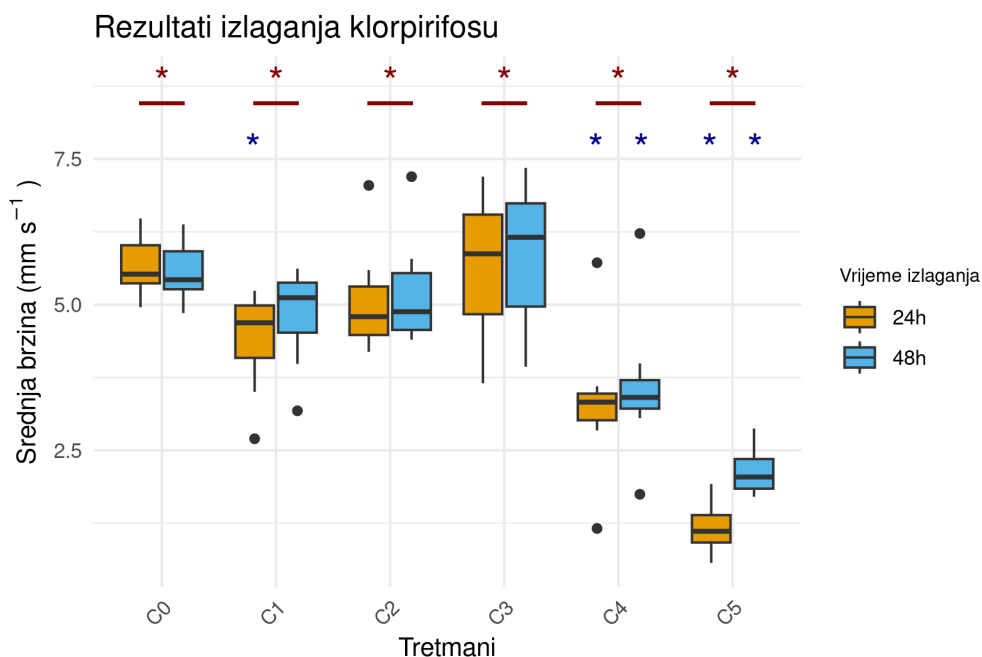
4.2.1.1. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na srednju brzinu kretanja (v_{av})

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 87). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod tretmana s BDC pri koncentracijama C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod BDC pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri svim koncentracijama (C1-C5) BDC.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 88). Nakon oba vremena izlaganja utvrđen je silazni trend ovog biheviorističkog elementa s povećanjem koncentracije zagađivala. Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su kod koncentracija C1, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su kod koncentracija C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri svim koncentracijama (C1-C5) CHP.

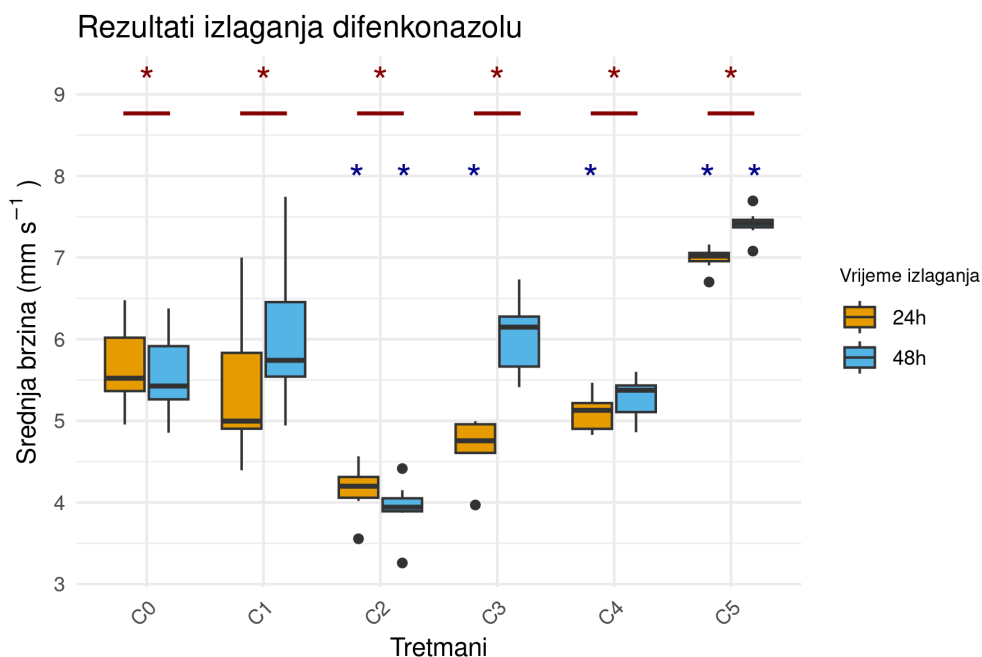


Slika 87. Utjecaj bendiokarba (BDC) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.



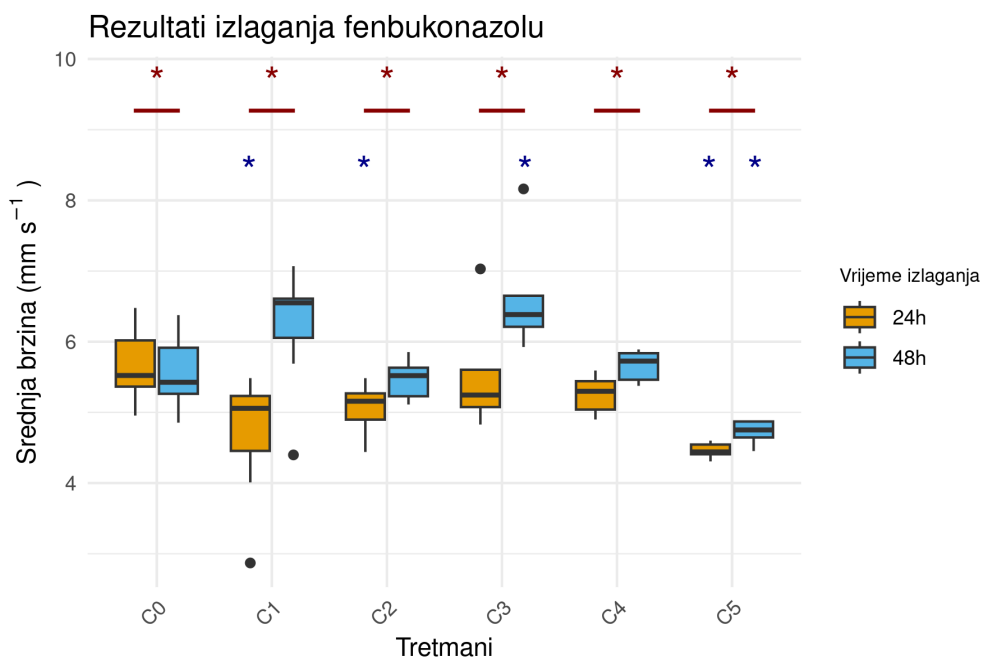
Slika 88. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 89). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati, razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C2 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri svim koncentracijama (C1-C5) DIF.



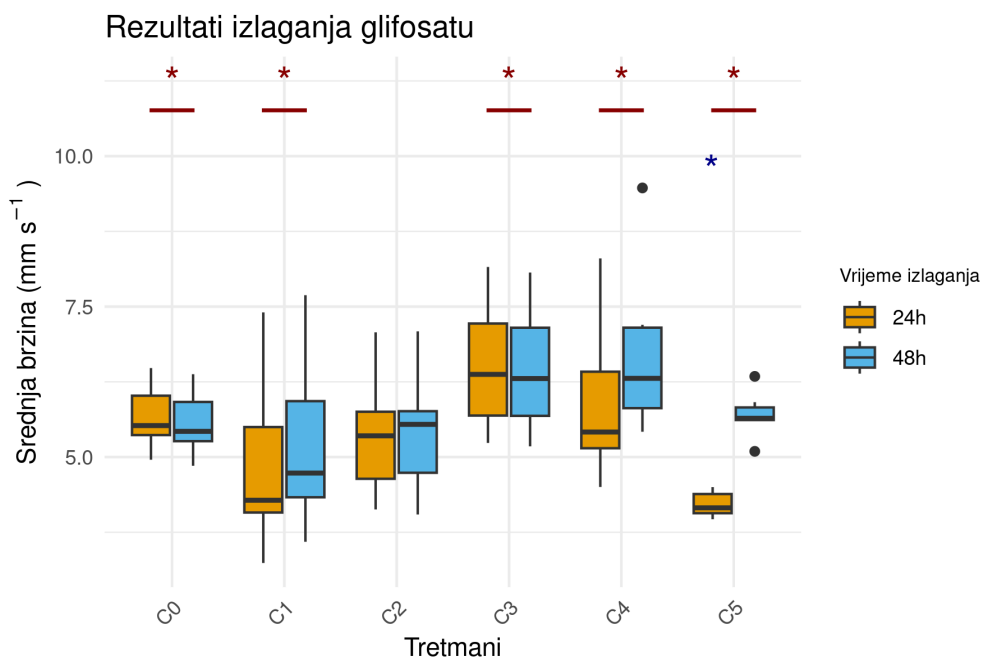
Slika 89. Utjecaj difenkonazola (DIF) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 90). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su nakon 24 sata pri koncentracijama C1, C2 i C5, dok su nakon 48 sati utvrđene pri koncentracijama C3 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri svim koncentracijama (C1-C5) FEN.



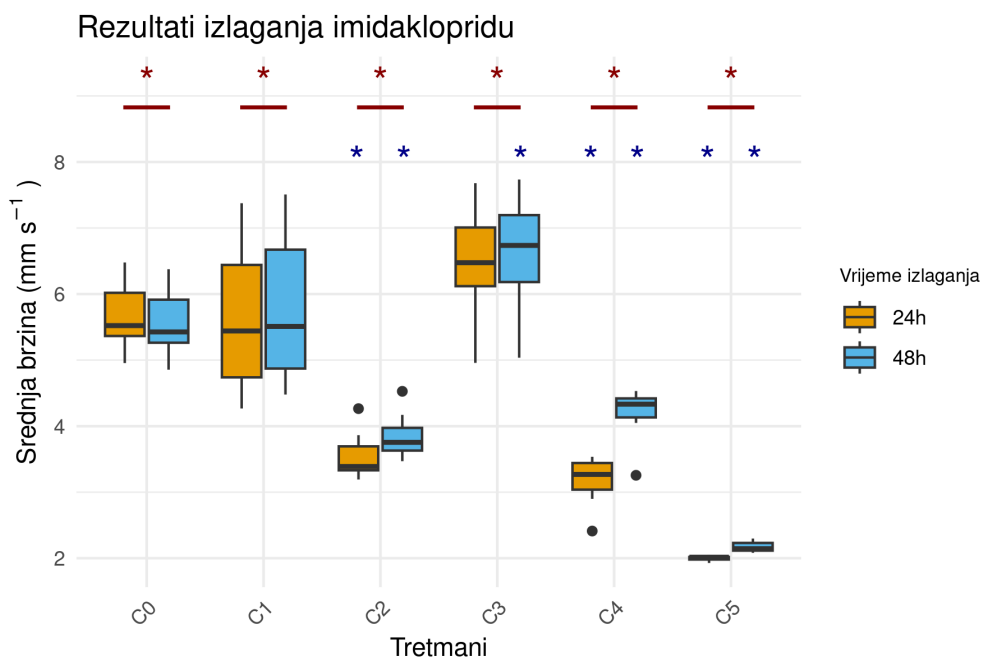
Slika 90. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 91). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu zabilježena je samo pri koncentraciji C5. Nakon 48 sati izloženosti, nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5 GLY.



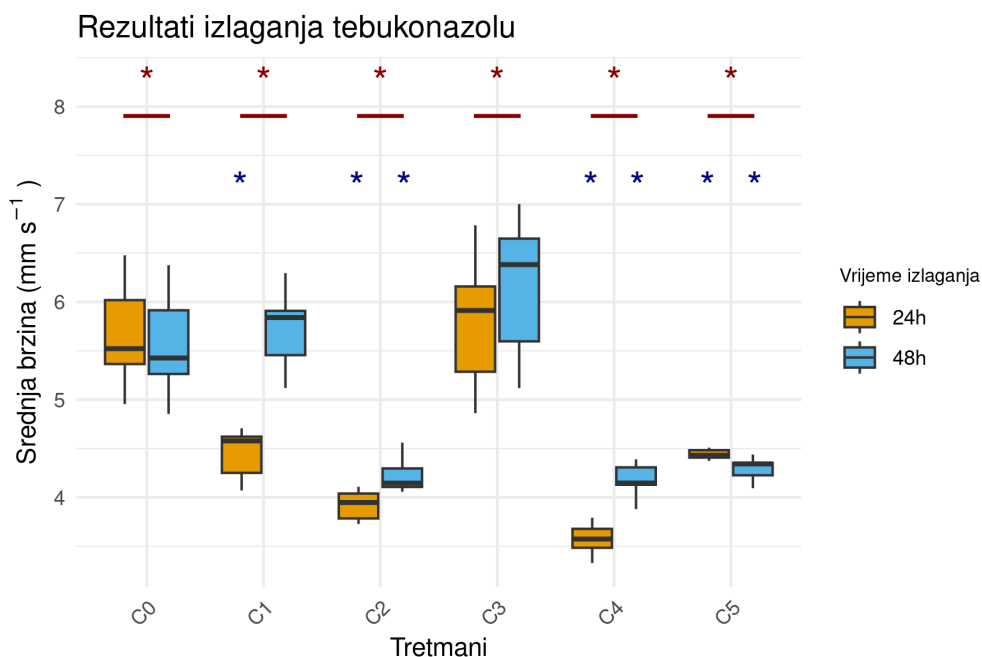
Slika 91. Utjecaj glifosata (GLY) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 92). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri svim koncentracijama (C1-C5) IMI.



Slika 92. Utjecaj imidakloprida (IMI) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

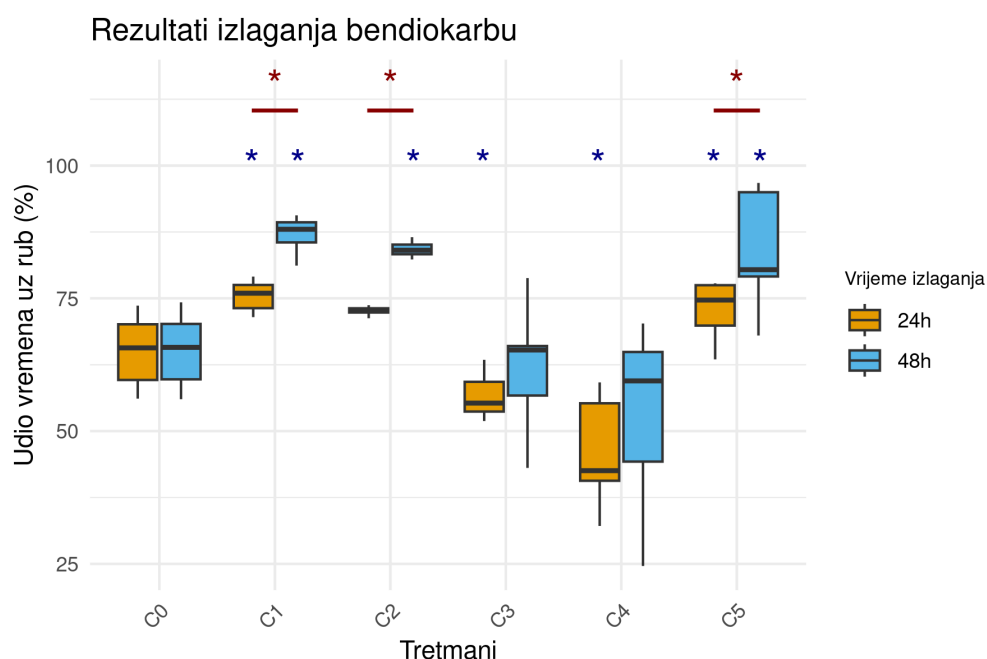
Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Srednja brzina kretanja (v_{av}) određena je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 93). Nakon 24 sata izloženosti, značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5. Nakon 48 sati statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su kod koncentracija C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između srednje brzine kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri svim koncentracijama (C1-C5) TEB.



Slika 93. Utjecaj tebukonazola (TEB) na srednju brzinu kretanja (v_{av}) tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazana je srednja brzina kretanja (v_{av}) izražena u milimetrima po sekundi (mm s^{-1}), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

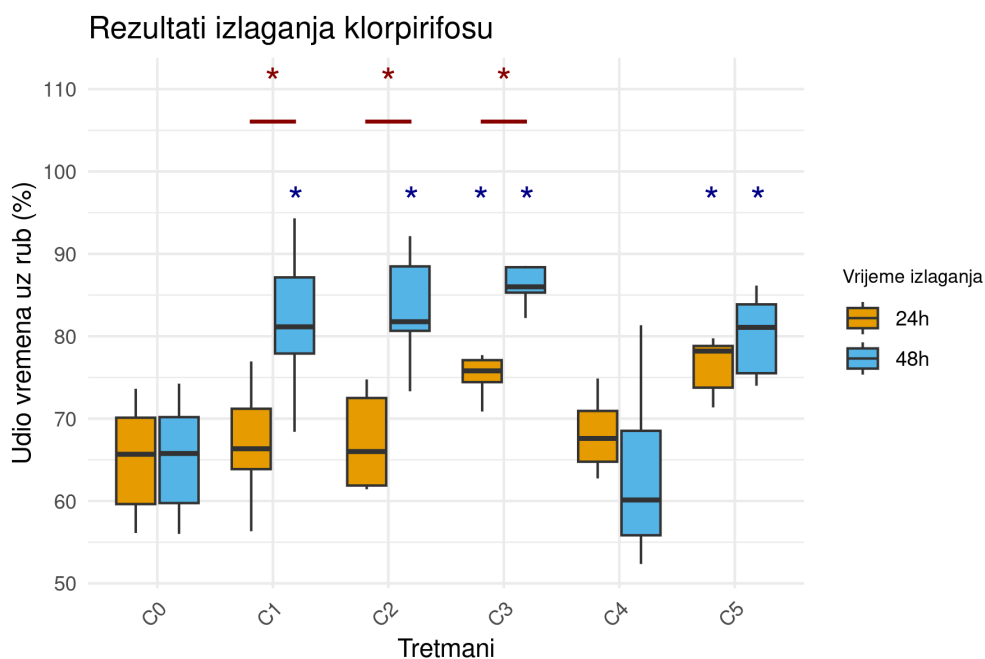
4.2.1.2. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 94). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5, dok su nakon 48 sati razlike opažene pri koncentracijama C1, C2 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2 i C5 BDC.



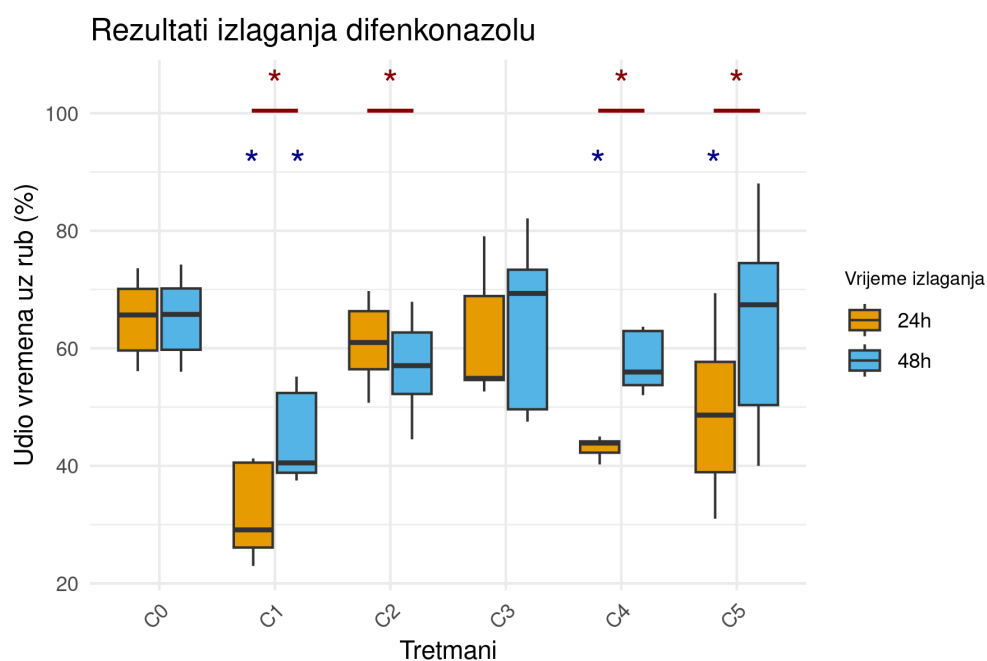
Slika 94. Utjecaj bendiokarba (BDC) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 95). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata zabilježene su pri koncentracijama C3 i C5, dok su nakon 48 sati zabilježene pri koncentracijama C1, C2, C3 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2 i C3 CHP.



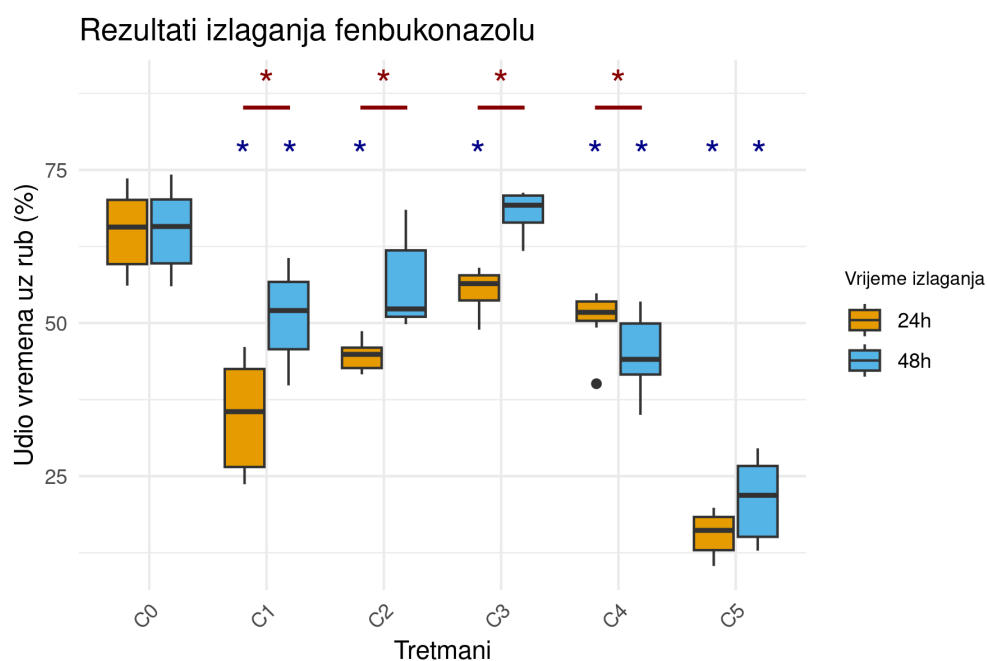
Slika 95. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 96). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C4 i C5. Nakon 48 sati statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu opažena je samo pri koncentraciji C1. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2, C4 i C5 DIF.



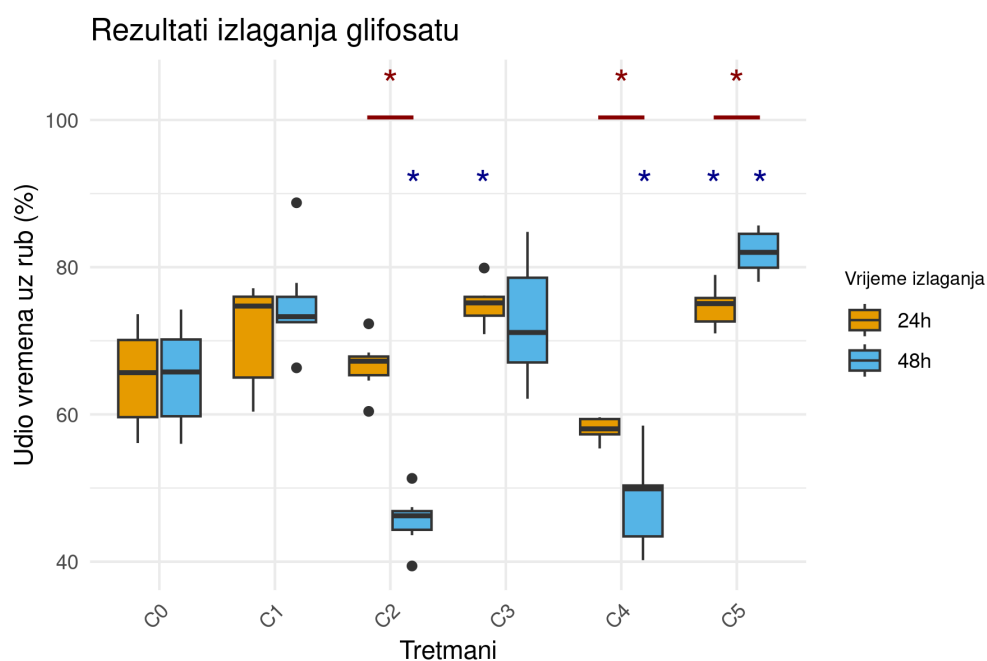
Slika 96. Utjecaj difenkonazola (DIF) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 97). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C1, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude kretanja nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4 FEN.



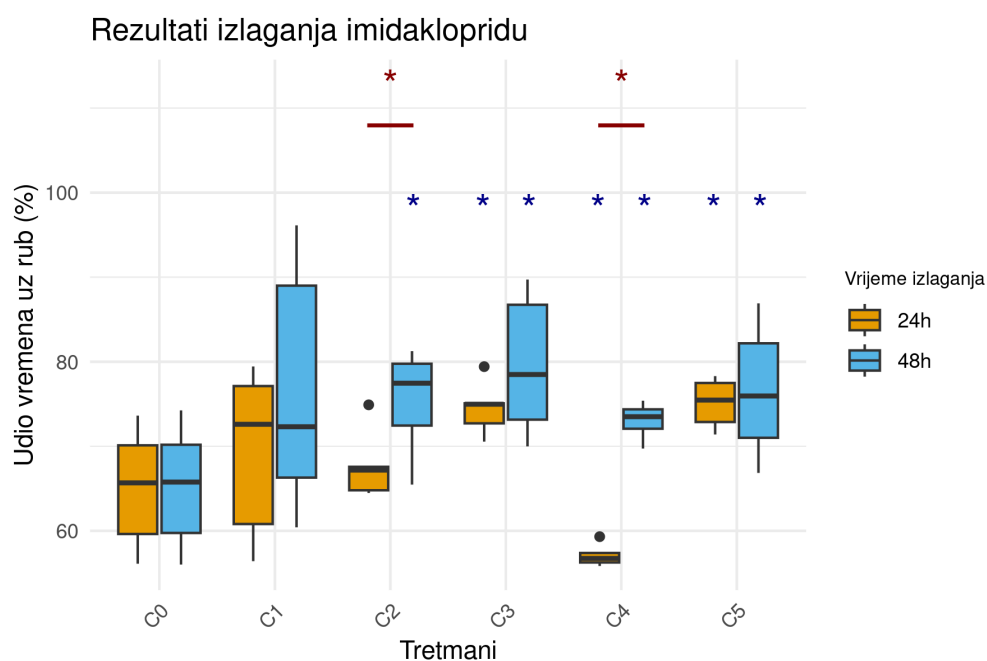
Slika 97. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 98). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata zabilježene su pri koncentracijama C3 i C5, dok su nakon 48 sati opažene pri koncentracijama C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2, C4 i C5 GLY.



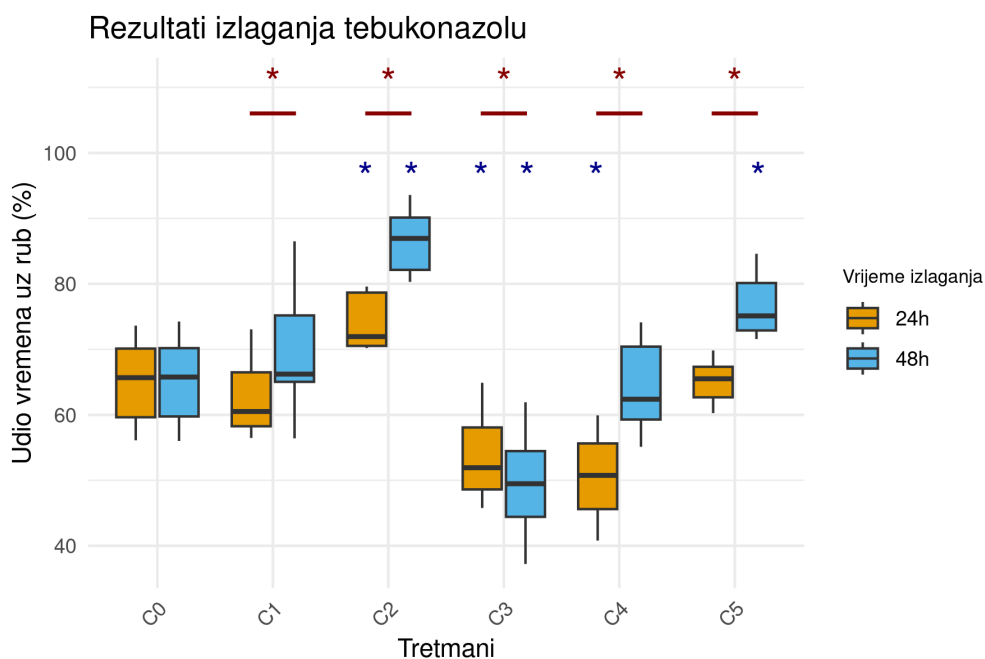
Slika 98. Utjecaj glifosata (GLY) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidaklopid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 99). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu opažene su pri koncentracijama C3, C4 i C5, dok su nakon 48 sati razlike uočene pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2 i C4 IMI.



Slika 99. Utjecaj imidakloprida (IMI) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

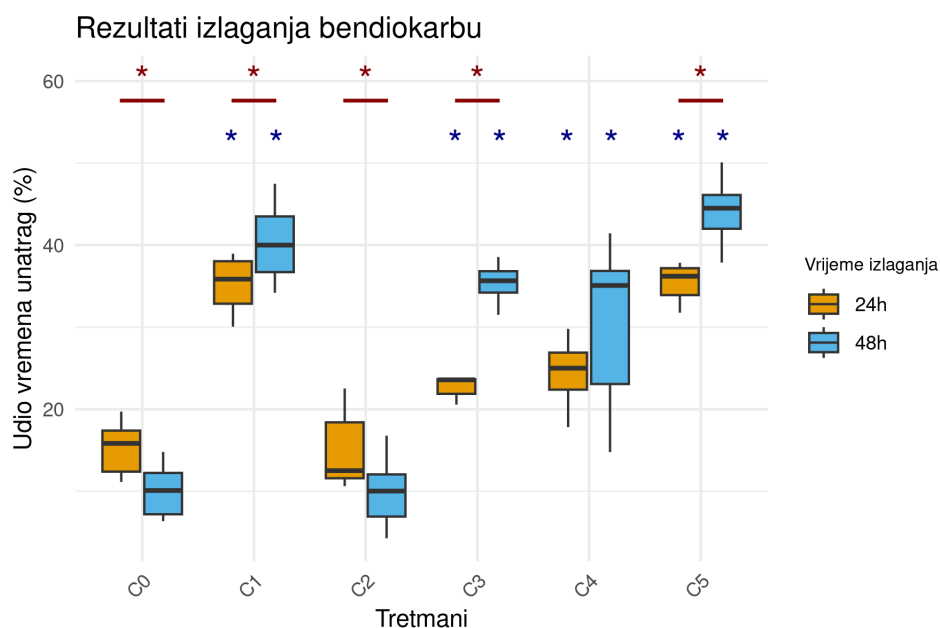
Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju uz rub Petrijeve zdjelice određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 100). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri koncentracijama C2, C3 i C4, dok su nakon 48 sati razlike zabilježene pri koncentracijama C2, C3 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju uz rub posude nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri svim koncentracijama (C1-C5) TEB.



Slika 100. Utjecaj tebukonazola (TEB) na udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden uz rub eksperimentalne posude izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

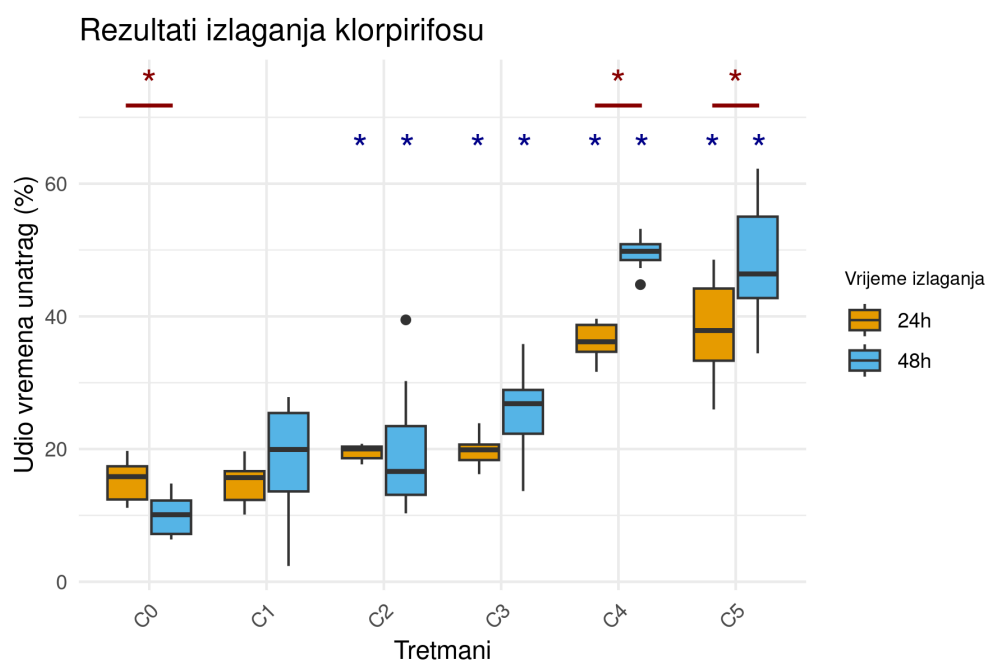
4.2.1.3. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na udio vremena proveden u kretanju unatrag

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 101). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu uočene su pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C1, C2, C3 i C5 BDC.



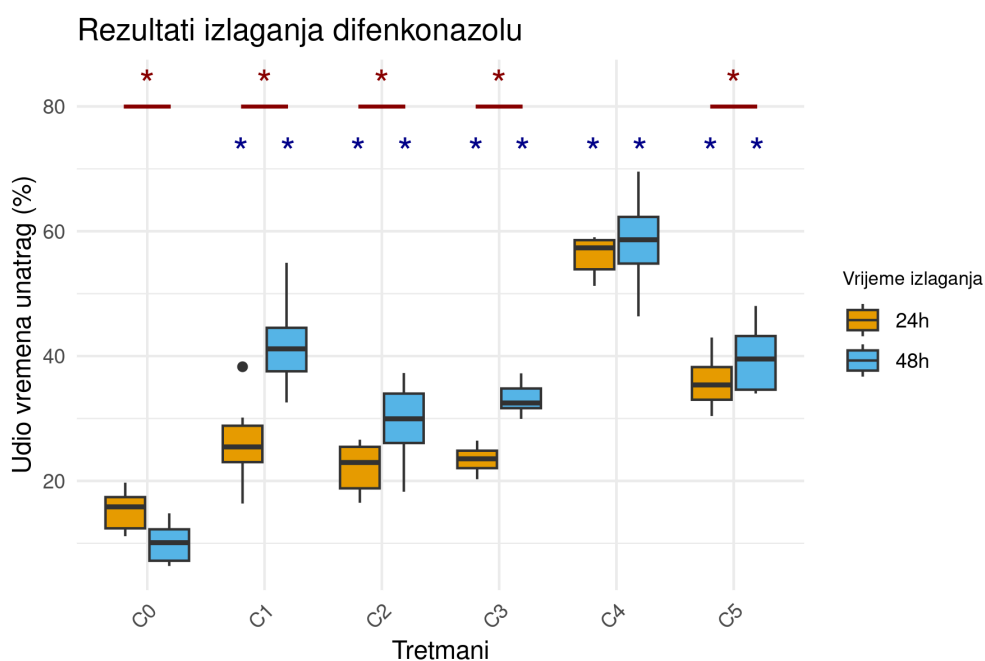
Slika 101. Utjecaj bendiokarba (BDC) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 102). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati izloženosti, razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C4 i C5 CHP.



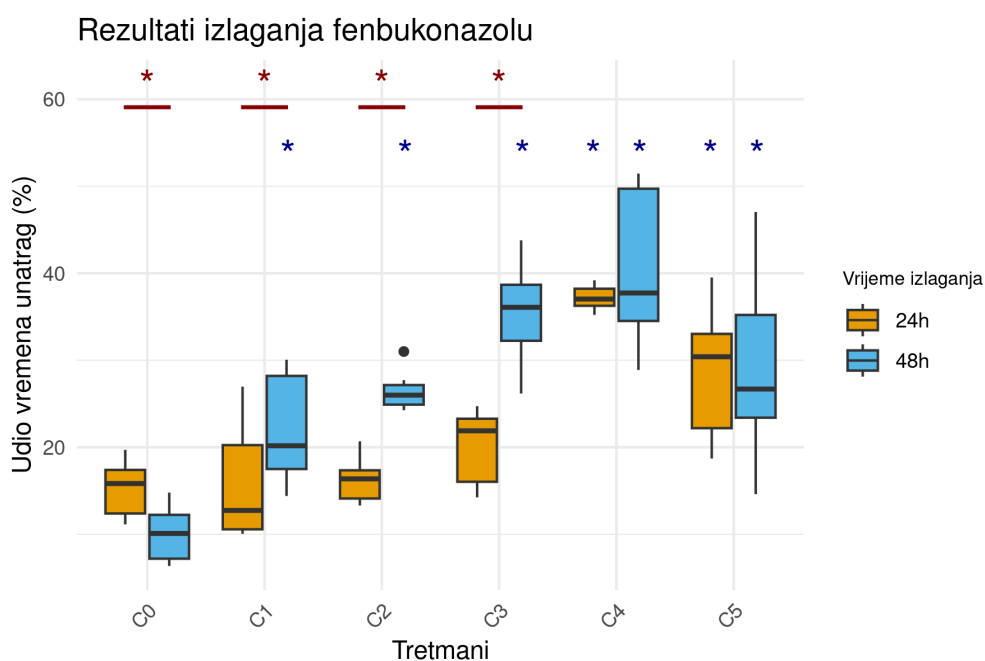
Slika 102. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 103). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri svim koncentracijama (C1-C5). Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C1, C2, C3 i C5 DIF.



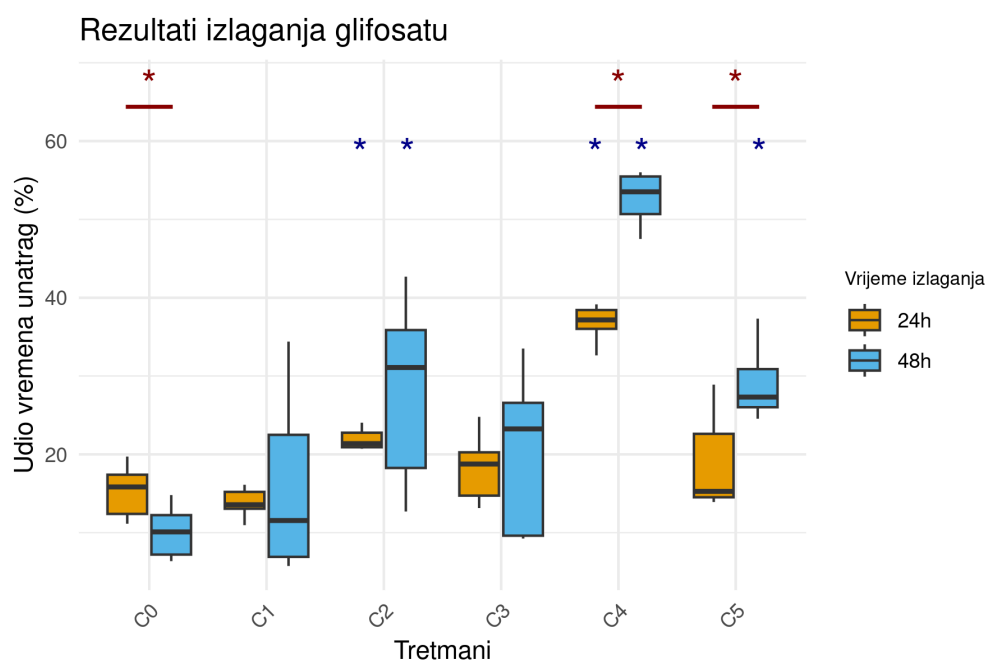
Slika 103. Utjecaj difenkonazola (DIF) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 104). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu opažene su pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim koncentracijama (C1-C5). Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C1, C2 i C3 FEN.



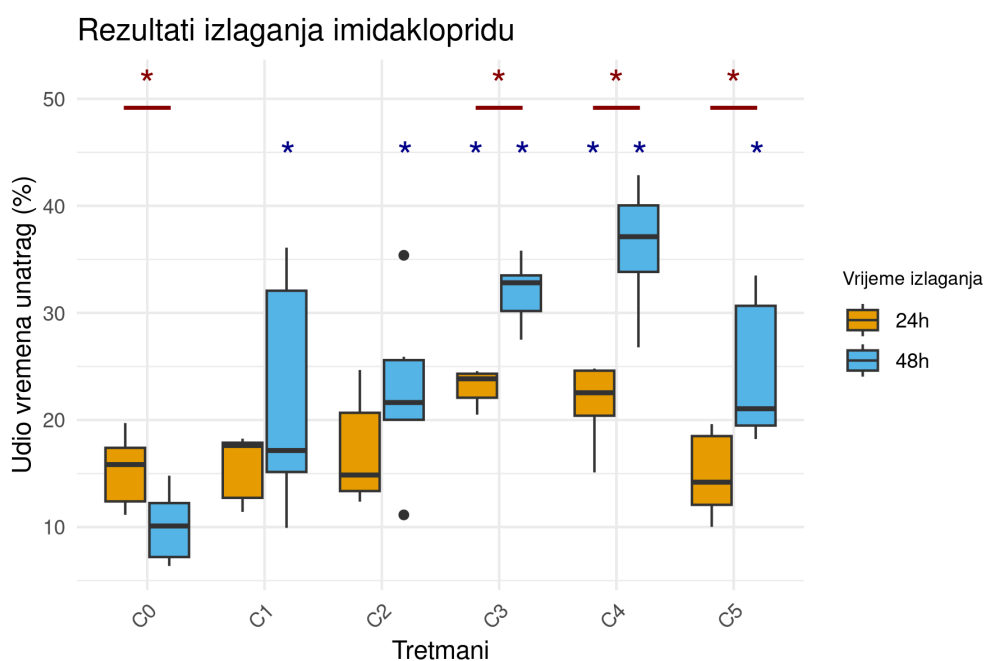
Slika 104. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 105). Nakon 24 sata izloženosti, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu opažene su pri koncentracijama C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C4 i C5 GLY.



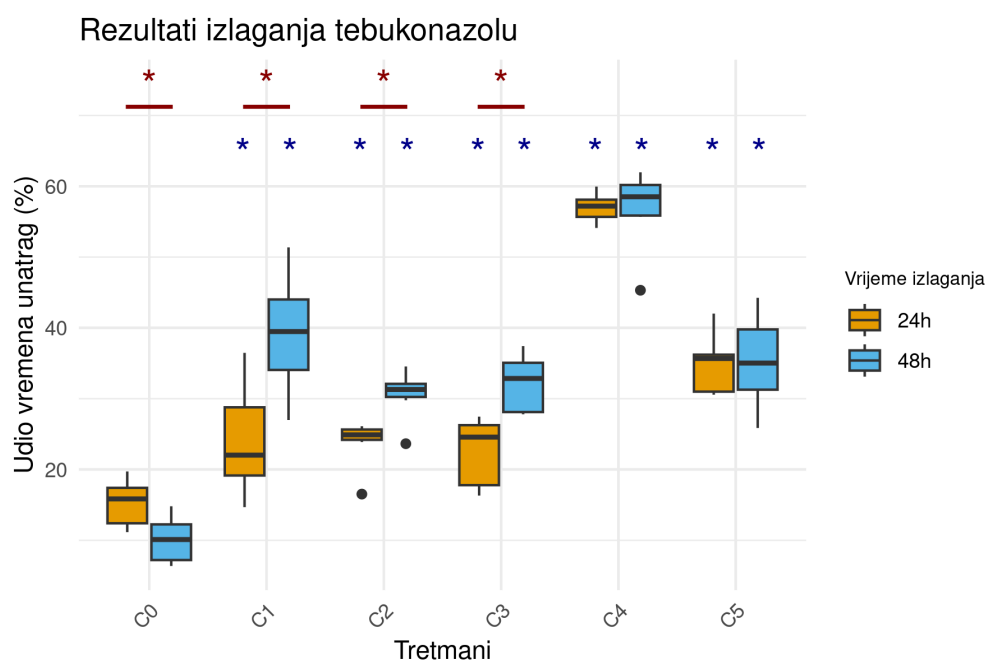
Slika 105. Utjecaj glifosata (GLY) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitim masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidaklopid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 106). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolu uočene su pri koncentracijama C3 i C4. Nakon 48 sati izloženosti, statistički značajne razlike zabilježene su pri koncentracijama C1, C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C3, C4 i C5 IMI.



Slika 106. Utjecaj imidaklopid (IMI) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

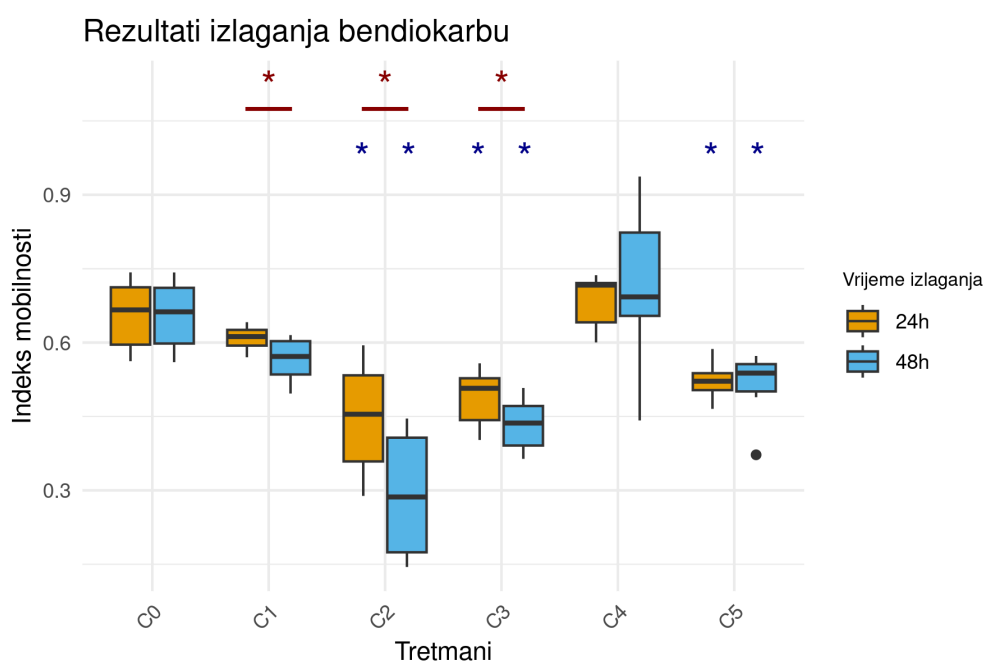
Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Udio vremena proveden u kretanju unatrag određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 107). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri svim koncentracijama (C1-C5). Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolnu zabilježene su pri svim koncentracijama (C1-C5). Statistički značajne razlike između udjela vremena provedenog u kretanju unatrag nakon 24 sata i 48 sati opažene su u kontrolnoj grupi te pri koncentracijama C1, C2 i C3 TEB.



Slika 107. Utjecaj tebukonazola (TEB) na udio vremena proveden u kretanju unatrag tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je udio vremena proveden u kretanju unatrag izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

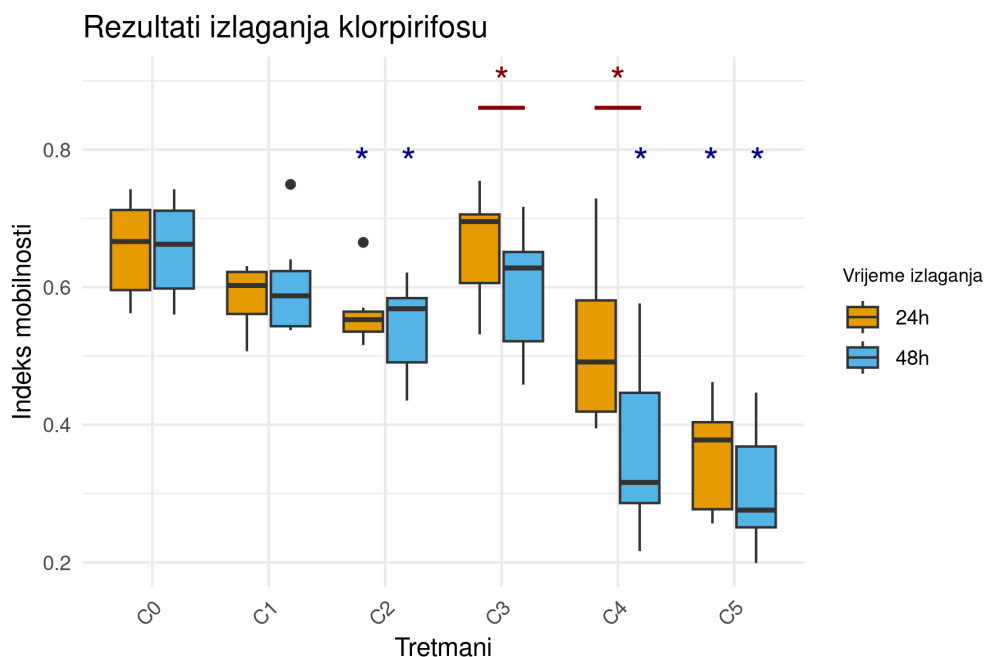
4.2.1.4. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na indeks pokretljivosti (MI)

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 108). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolnu grupu opažene su pri koncentracijama C2, C3 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2 i C3 BDC.



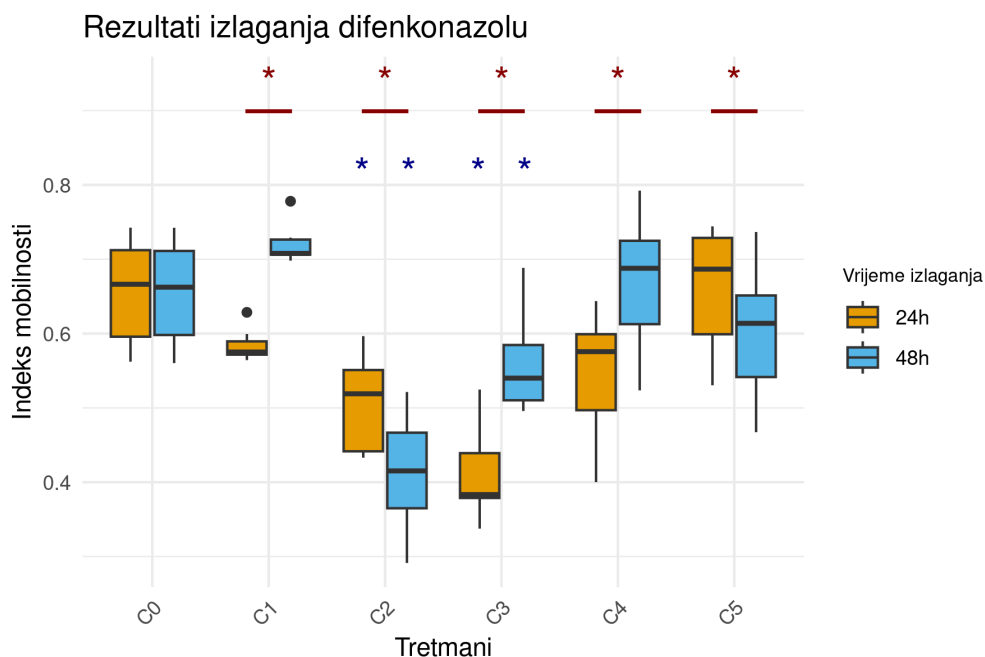
Slika 108. Utjecaj bendiokarba (BDC) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifosa (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 109). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri koncentracijama C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C3 i C4 CHP.



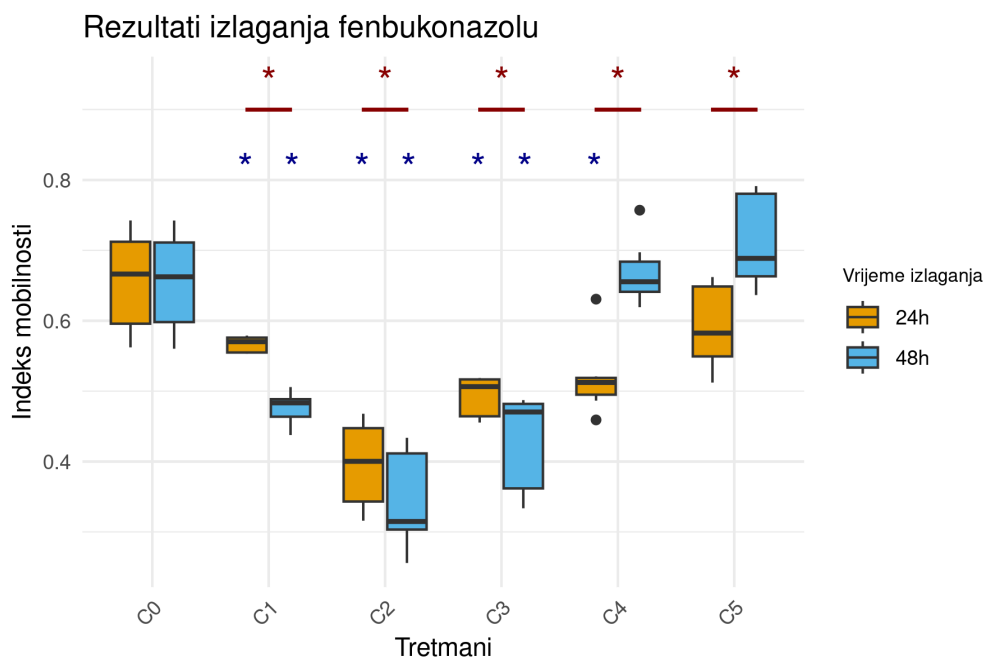
Slika 109. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazola (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 110). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2 i C3. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri koncentracijama C2 i C3. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri svim koncentracijama (C1-C5) DIF.



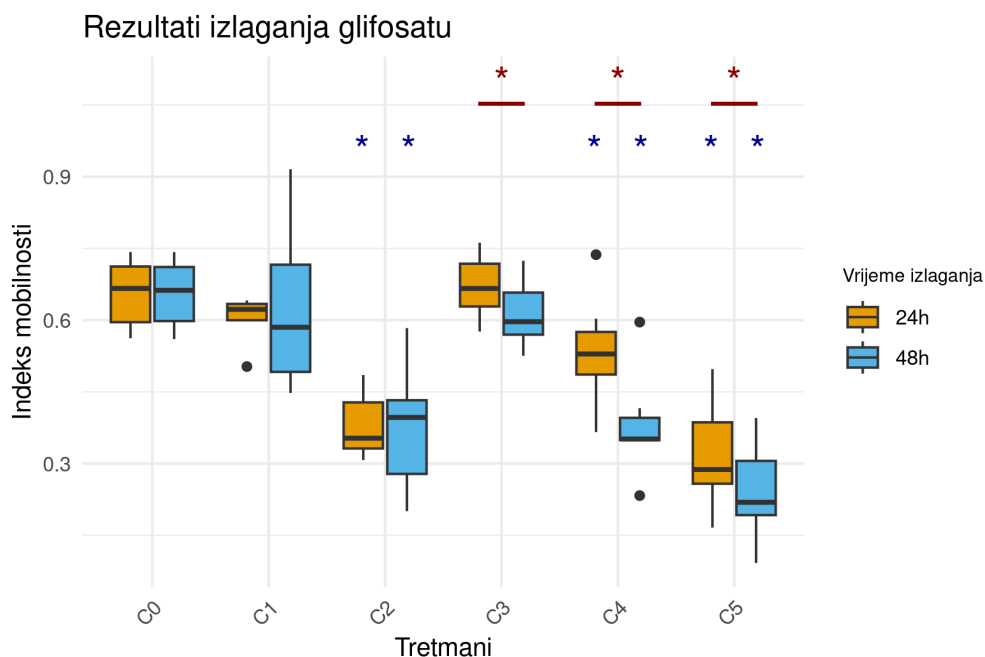
Slika 110. Utjecaj difenkonazola (DIF) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazola (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 111). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2 i C3. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri svim koncentracijama (C1-C5) FEN.



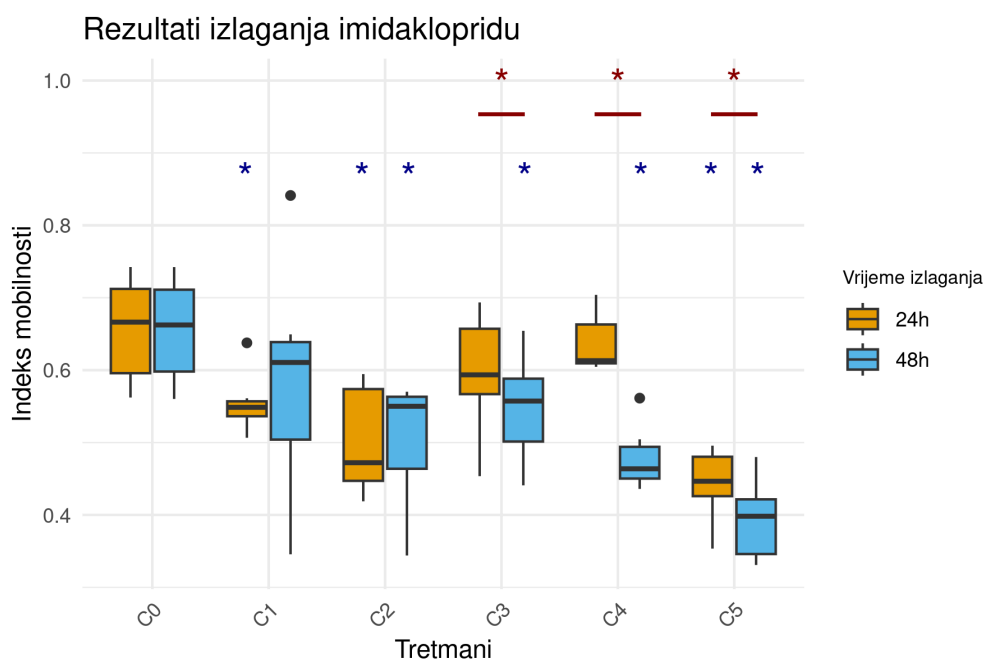
Slika 111. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosata (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 112). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri koncentracijama C2, C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C2, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri svim koncentracijama C3, C4 i C5 GLY.



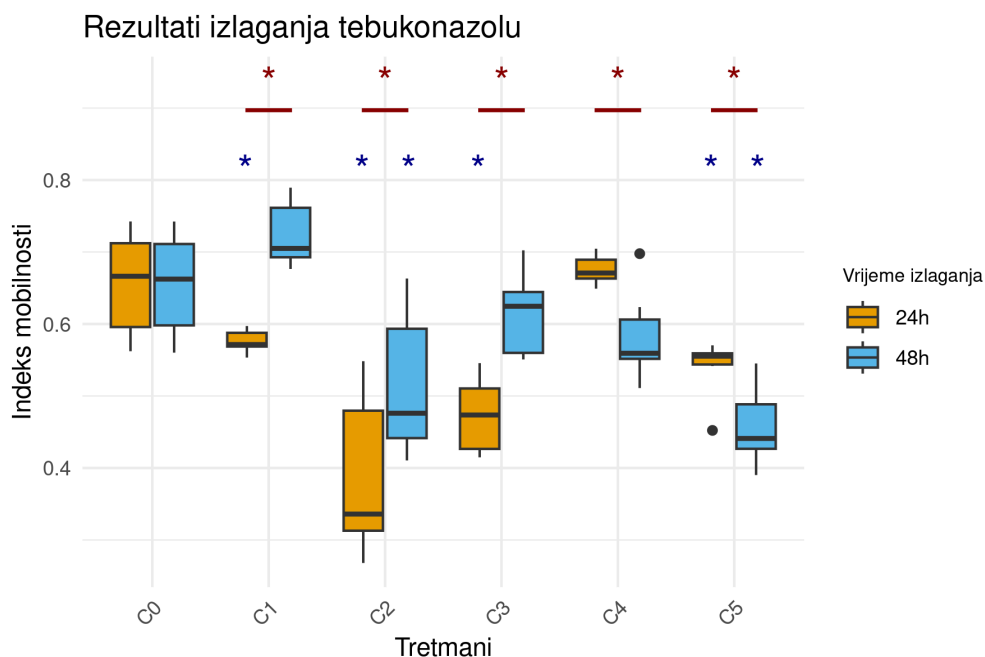
Slika 112. Utjecaj glifosata (GLY) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidakloprida (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 113). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolnu grupu uočene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri svim koncentracijama C3, C4 i C5 IMI.



Slika 113. Utjecaj imidakloprida (IMI) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

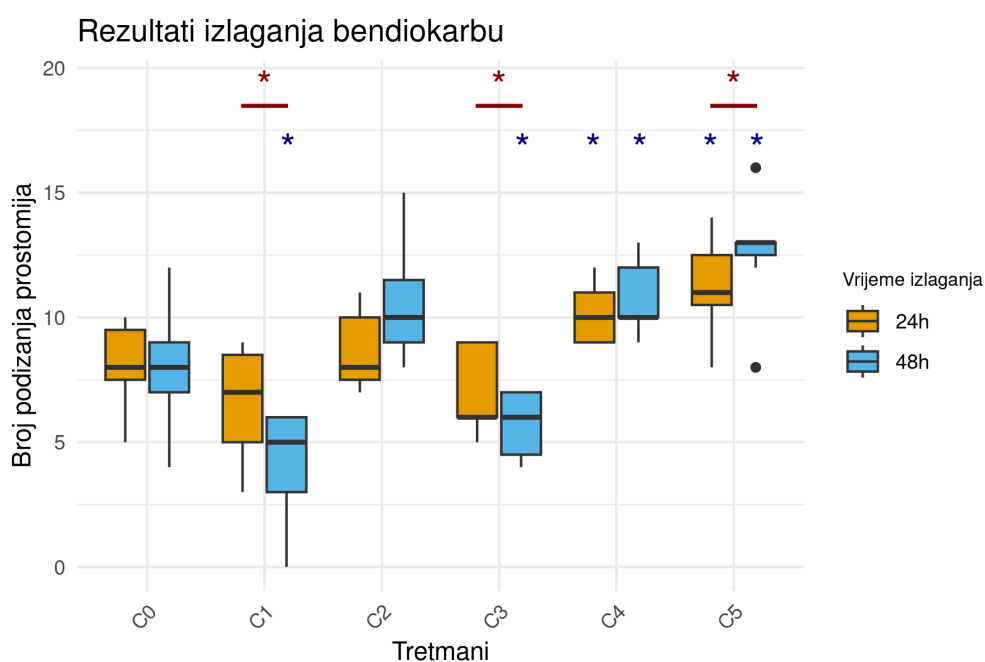
Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazola (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Indeks pokretljivosti određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 114). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolnu grupu uočene su pri koncentracijama C2 i C5. Statistički značajne razlike između indeksa pokretljivosti nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri svim koncentracijama TEB.



Slika 114. Utjecaj tebukonazola (TEB) na indeks pokretljivosti tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je indeks pokretljivosti izražen u postotku (%), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

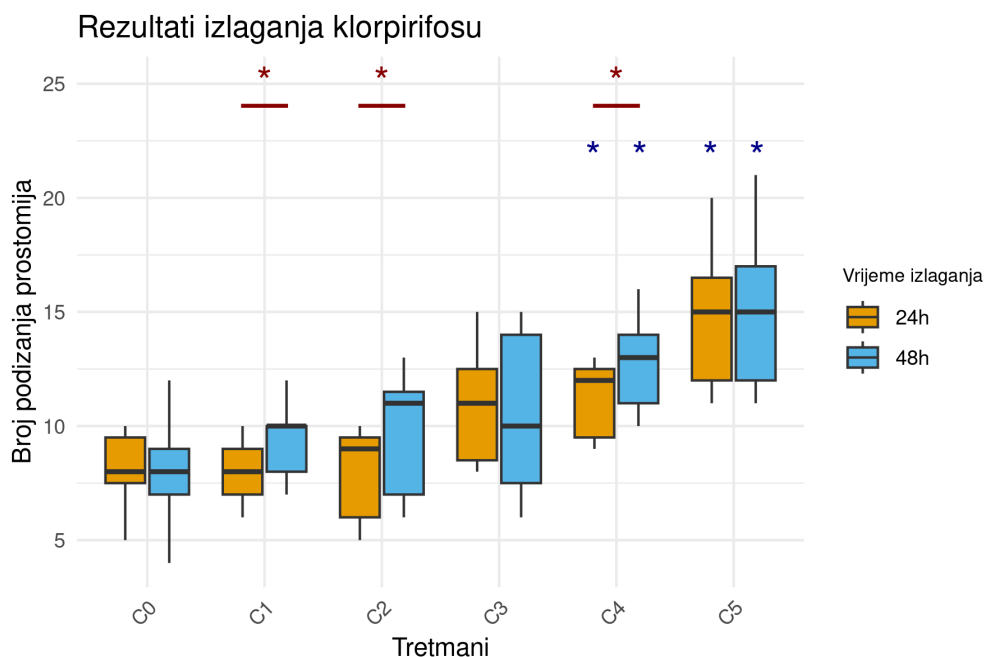
4.2.1.4. Utjecaj koncentracije zagađivala i trajanja izlaganja na broj podizanja prostomija

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari bendiokarb (BDC) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 115). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5. Statistički značajne razlike između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C3 i C5 BDC.



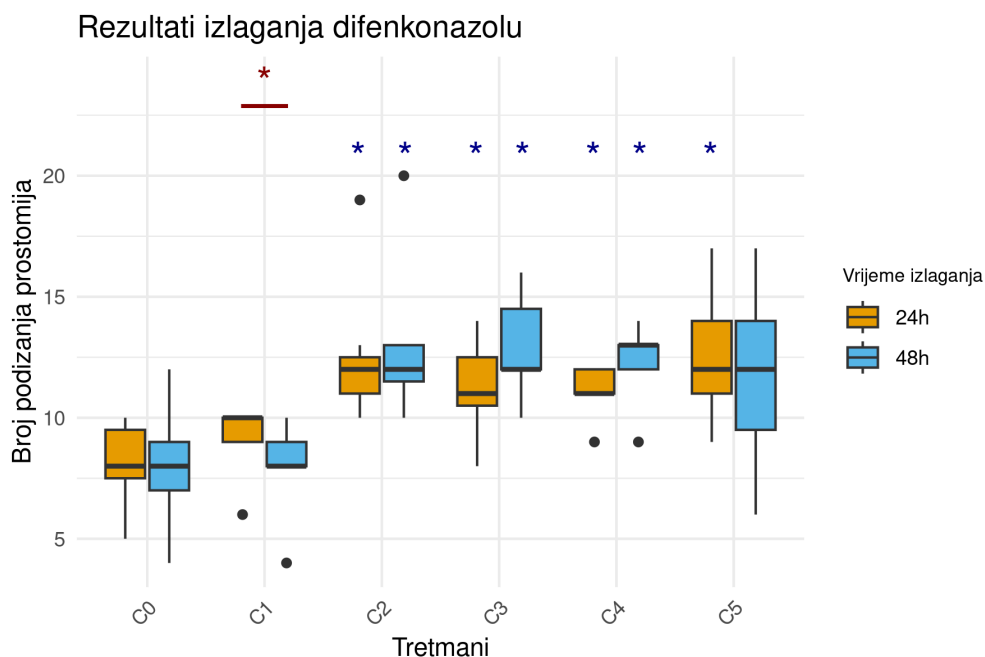
Slika 115. Utjecaj bendiokarba (BDC) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari klorpirifos (CHP) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 116). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu uočene su pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C4 i C5. Statistički značajne razlike između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2 i C4 CHP.



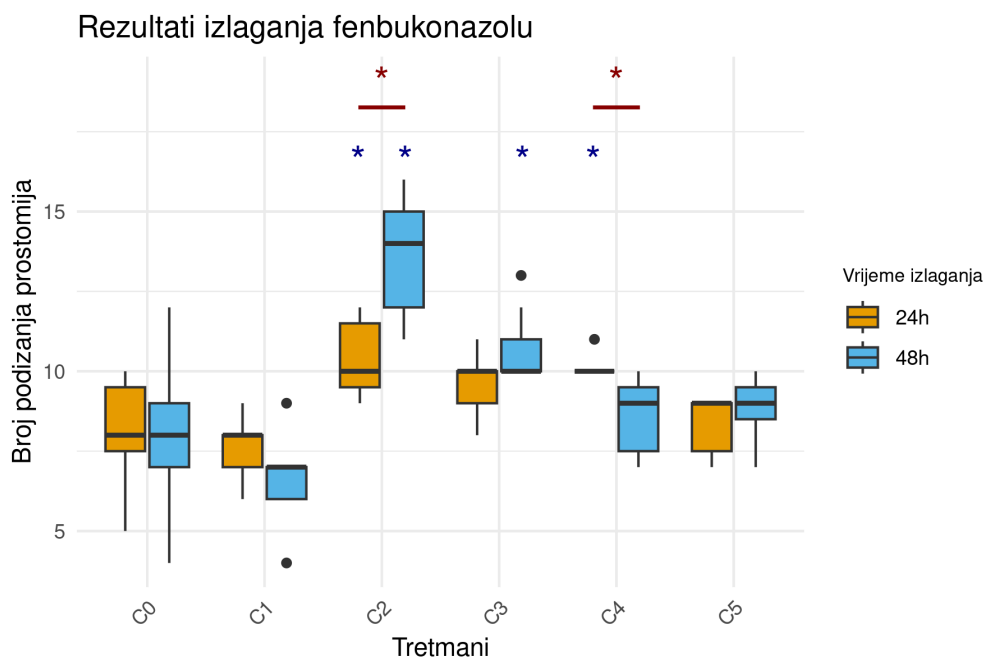
Slika 116. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari difenkonazol (DIF) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 117). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu opažene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C2, C3 i C4. Statistički značajna razlika između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C1 DIF.



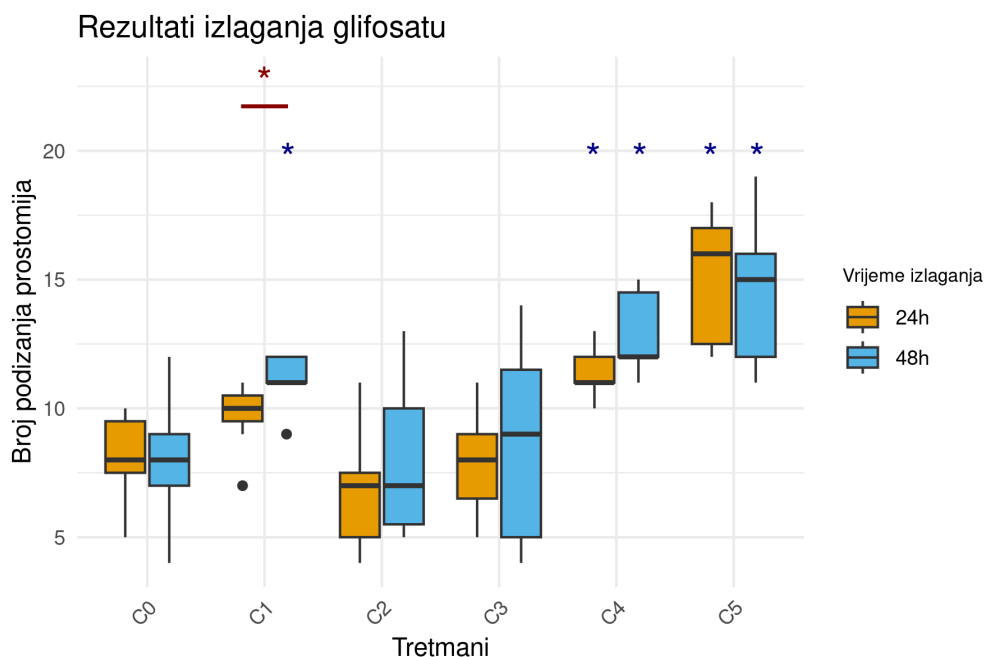
Slika 117. Utjecaj difenkonazola (DIF) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari fenbukonazol (FEN) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 118). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu opažene su pri koncentracijama C2 i C4. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C2 i C3. Statistički značajne razlike između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2 i C4 FEN.



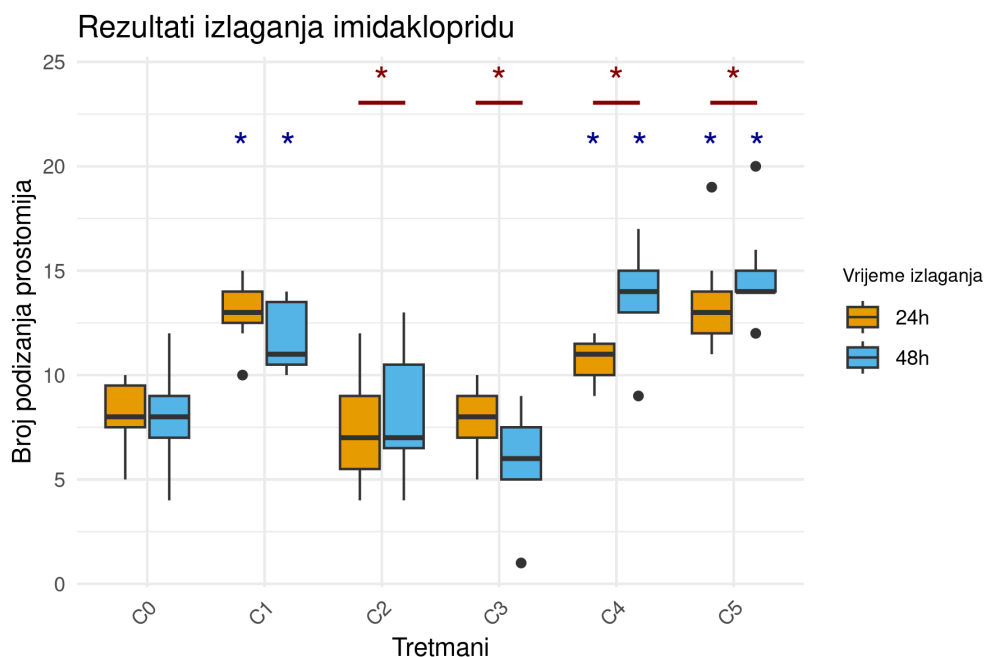
Slika 118. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari glifosat (GLY) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 119). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri koncentracijama C1, C4 i C5. Statistički značajna razlika između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažena je pri koncentraciji C1 GLY.



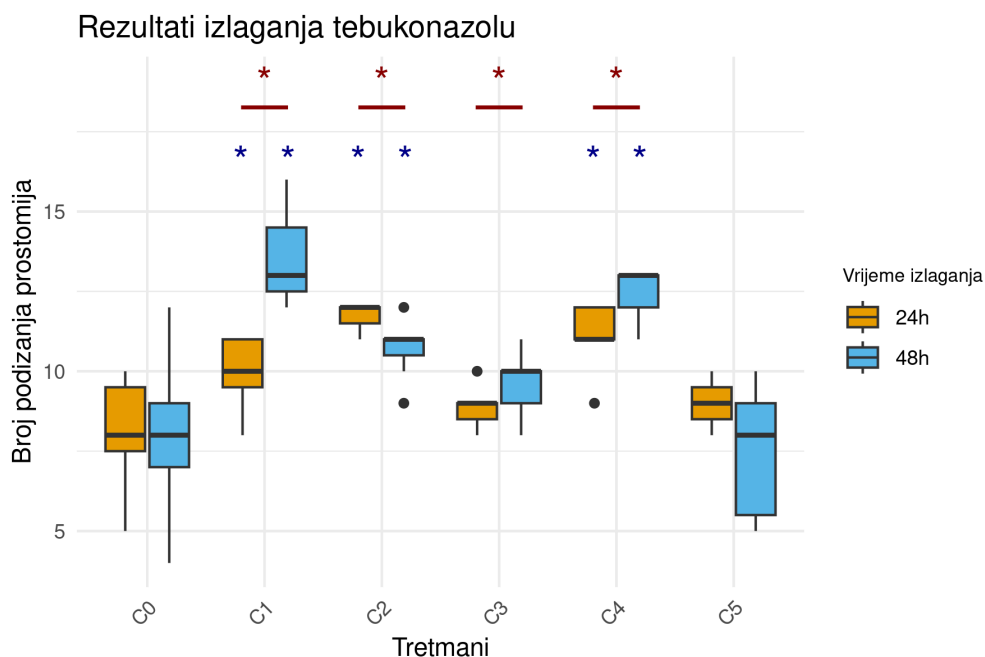
Slika 119. Utjecaj glifosata (GLY) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari imidaklopid (IMI) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 120). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C4 i C5. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su pri koncentracijama C1, C4 i C5. Statistički značajne razlike između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 IMI.



Slika 120. Utjecaj imidakloprida (IMI) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

Gujavice su izlagane različitim koncentracijama komercijalnog pripravka s aktivnom tvari tebukonazol (TEB) u ukupnom trajanju 48 sati. Broj podizanja prostomija određen je nakon 24 sata i 48 sati, a rezultati su prikazani u obliku kutijastog dijagrama (Slika 121). Nakon 24 sata izloženosti, razlike u odnosu na kontrolnu grupu zabilježene su pri koncentracijama C1, C2 i C4. Nakon 48 sati razlike u odnosu na kontrolu opažene su pri koncentracijama C1, C2 i C4. Statistički značajne razlike između broja podizanja prostomija nakon 24 sata i 48 sati opažene su pri koncentracijama C1, C2, C3 i C4 TEB.

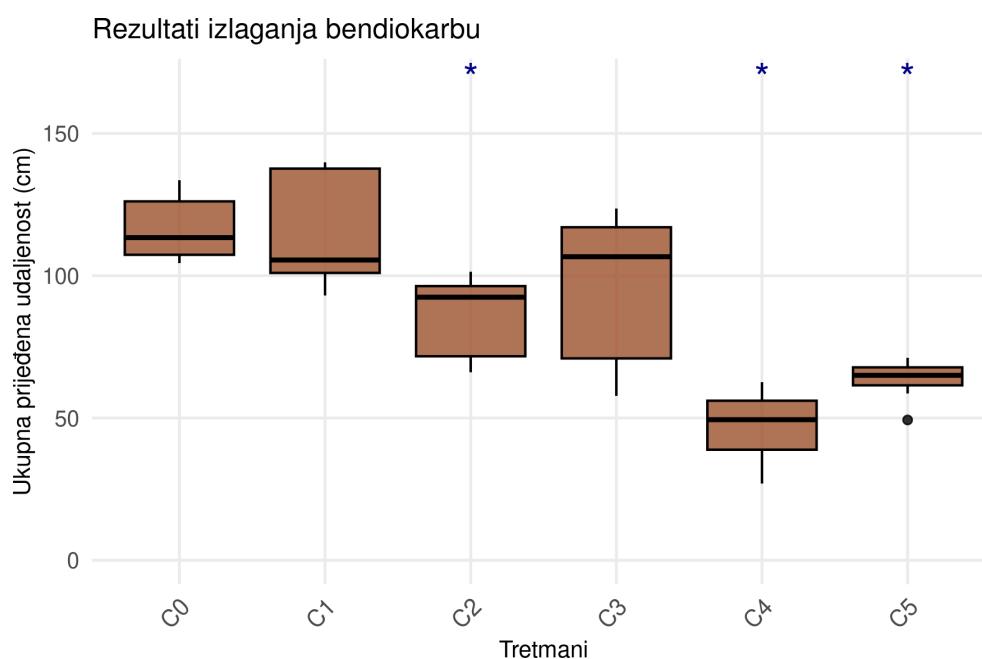


Slika 121. Utjecaj tebukonazola (TEB) na broj podizanja prostomija tijekom izloženosti u trajanju od 24 sata (žute kutije) i 48 sati (plave kutije). Na y-osi prikazan je broj podizanja prostomija, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su plavim zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti ovog biheviorističkog elementa izmjerenih nakon 24 sata i 48 sati unutar svake eksperimentalne grupe naznačene su crvenim zvjezdicama i horizontalnim crvenim linijama između odgovarajućih parova kutija.

4.2.2. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na biheviorističke elemente gujavica

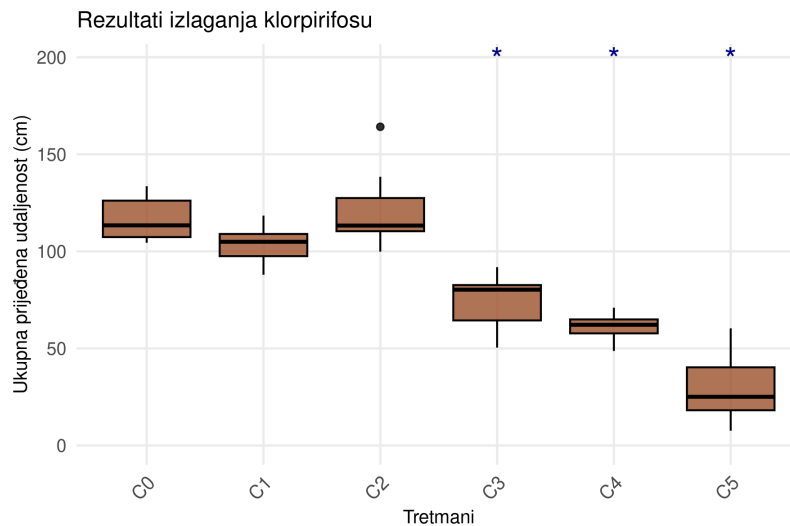
4.2.2.1. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na ukupnu prijeđenu udaljenost

U istraživanju je analiziran utjecaj različitih koncentracija odabranih pesticida na ukupno prijeđeni put gujavica u umjetnom tlu tijekom izlaganja. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$) zabilježene su pretežito pri višim koncentracijama tretmana, osim u pojedinim nižim koncentracijama kod specifičnih pesticida. Kod tretmana s BDC, ukupno prijeđeni put bio je značajno manji pri koncentracijama C2, C4 i C5 (Slika 121).

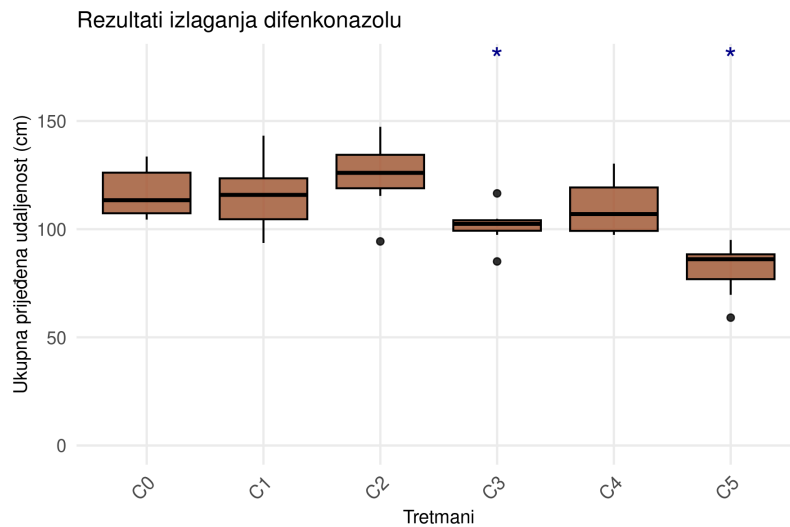


Slika 121. Utjecaj bendiokarba (BDC) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

Kod tretmana s CHP, značajne razlike u ukupno prijeđenom putu utvrđene su pri koncentracijama C3, C4 i C5 (Slika 122). U slučaju tretmana s DIF, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu utvrđene su pri koncentracijama C3 i C5 (Slika 123).

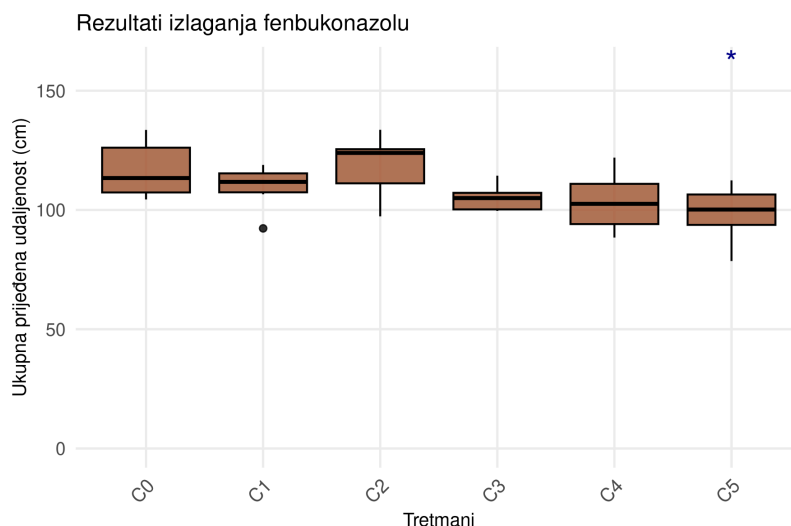


Slika 122. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

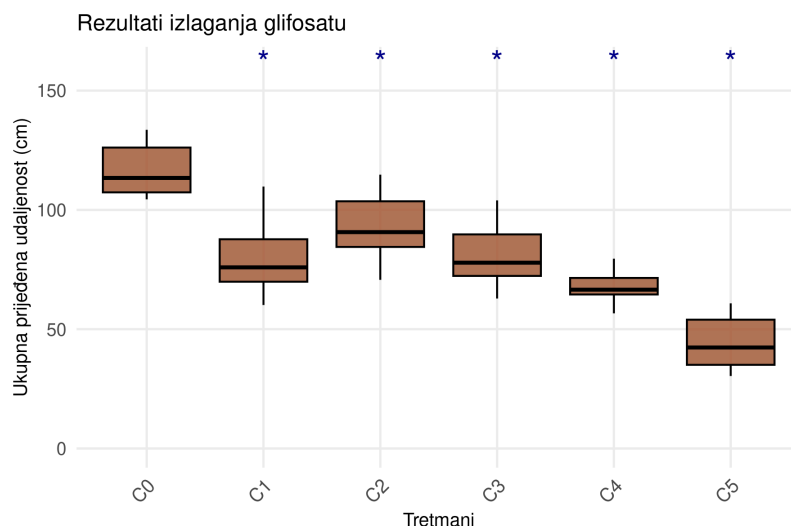


Slika 123. Utjecaj difenkonazola (DIF) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

U pokusu s FEN statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je pri najvišoj koncentraciji (C5) (Slika 124). Tretman s GLY rezultirao je statistički značajnim padom u ukupno prijeđenom putu pri svim koncentracijama (Slika 125).

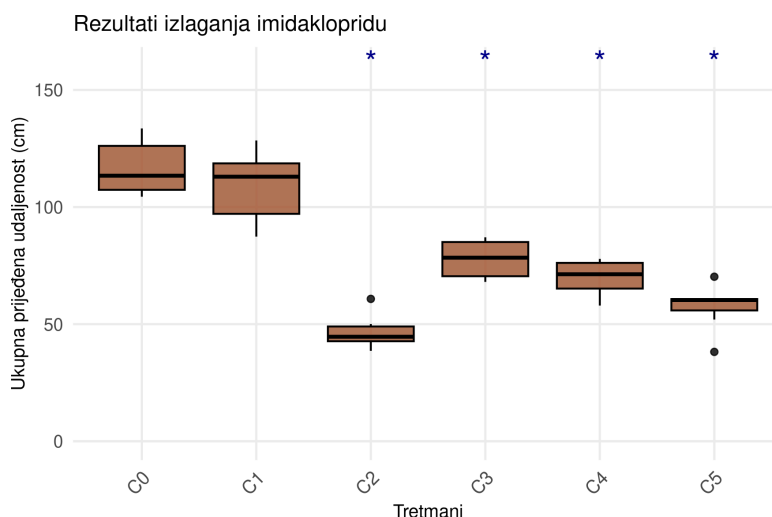


Slika 124. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

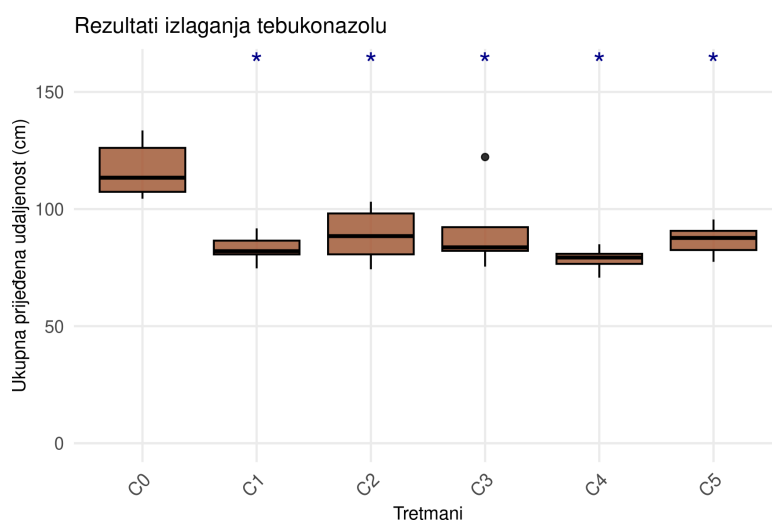


Slika 125. Utjecaj glifosata (GLY) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedju (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

Izlaganje pesticidu IMI rezultiralo je statistički značajnim smanjenjem ukupno prijeđenog puta pri koncentracijama C2-C5, dok pri C1 nije zabilježena značajna razlika (Slika 126). Kod tretmana s TEB, značajni pad u ukupno prijeđenom putu zabilježen je pri svim koncentracijama (Slika 127).



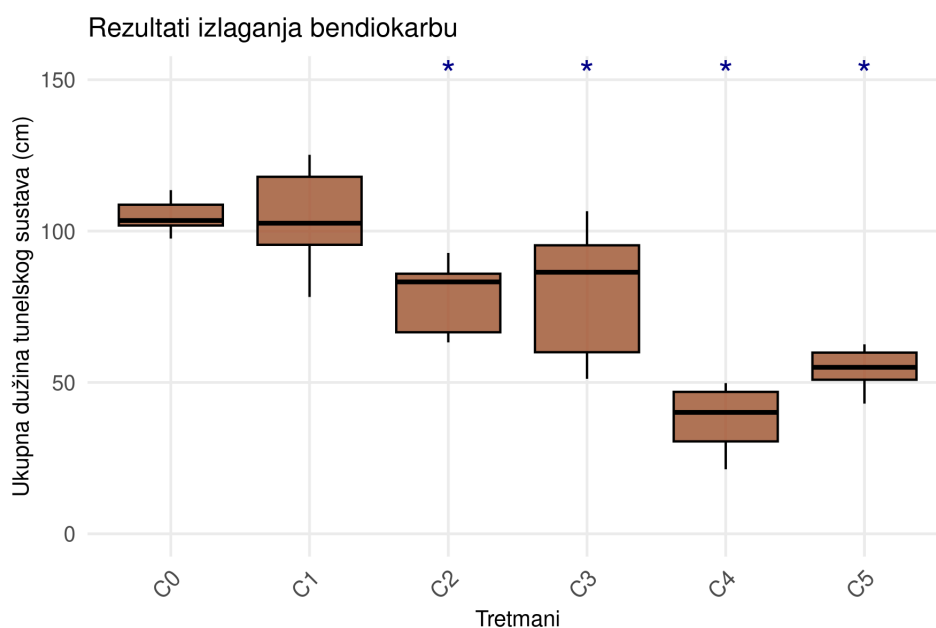
Slika 126. Utjecaj imidakloprida (IMI) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



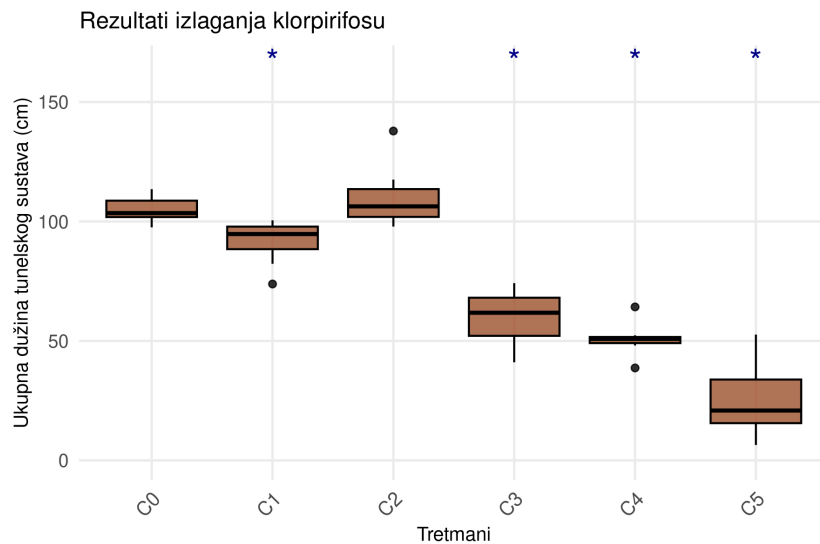
Slika 127. Utjecaj tebukonazola (TEB) na ukupnu prijeđenu udaljenost. Na y-osi prikazana je ukupna prijeđena udaljenost izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

4.2.2.2. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na ukupnu dužinu tunelskog sustava

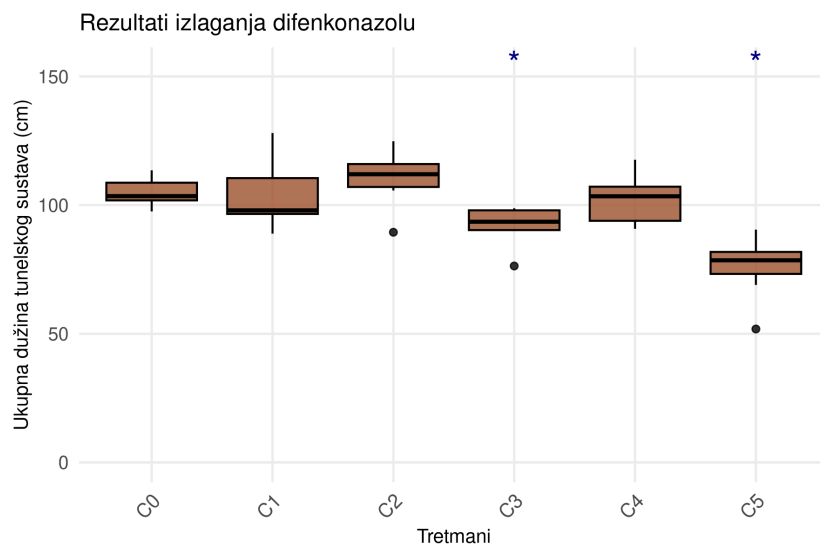
U istraživanju su analizirani učinci različitih koncentracija odabranih pesticida na ukupnu dužinu tunelskog sustava gujavica u umjetnom tlu nakon izlaganja. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$) zabilježene su za određene tretmane i koncentracije. Kod tretmana s BDC, značajno smanjenje duljine tunelskog sustava primijećeno je pri koncentracijama C2, C3, C4 i C5 (Slika 128). U slučaju CHP tretmana, značajne razlike zabilježene su pri koncentracijama C1, C3, C4 i C5 (Slika 129). Izlaganje gujavica DIF tretmanu rezultiralo je statistički značajnim smanjenjem duljine tunela pri koncentracijama C3 i C5 (Slika 130). Kod tretmana s FEN, značajne razlike uočene su pri koncentracijama C1, C3 i C5 (Slika 131). Sve koncentracije GLY tretmana (C1-C5) uzrokovale su značajno smanjenje duljine tunela u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 132). Slično tome, kod tretmana s IMI, utvrđeno je statistički značajno smanjenje tunelskog sustava pri koncentracijama C2-C5 (Slika 133). Tretman TEB također je pokazao značajno smanjenje duljine tunela pri svim koncentracijama (C1-C5) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 134).



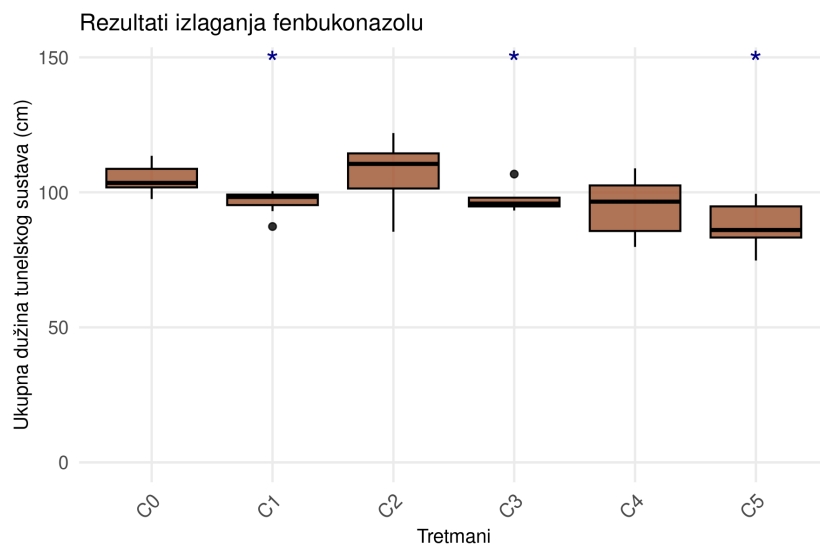
Slika 128. Utjecaj bendiokarba (BDC) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



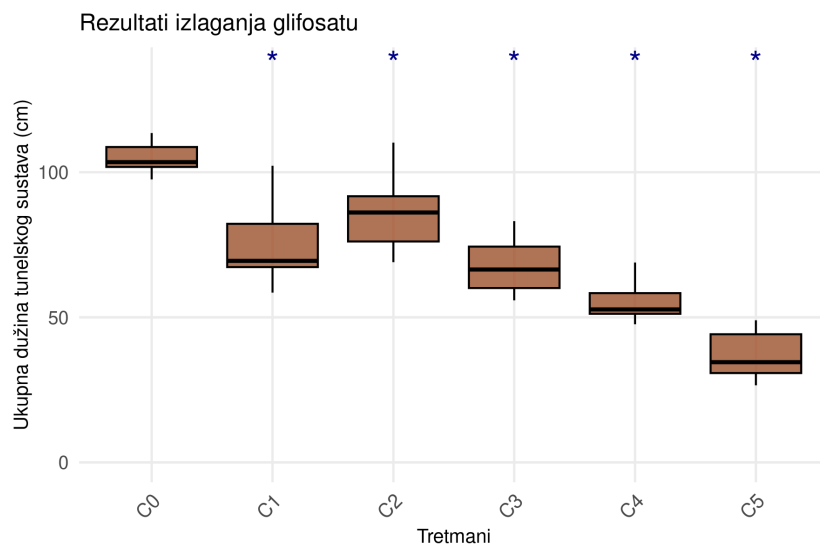
Slika 129. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



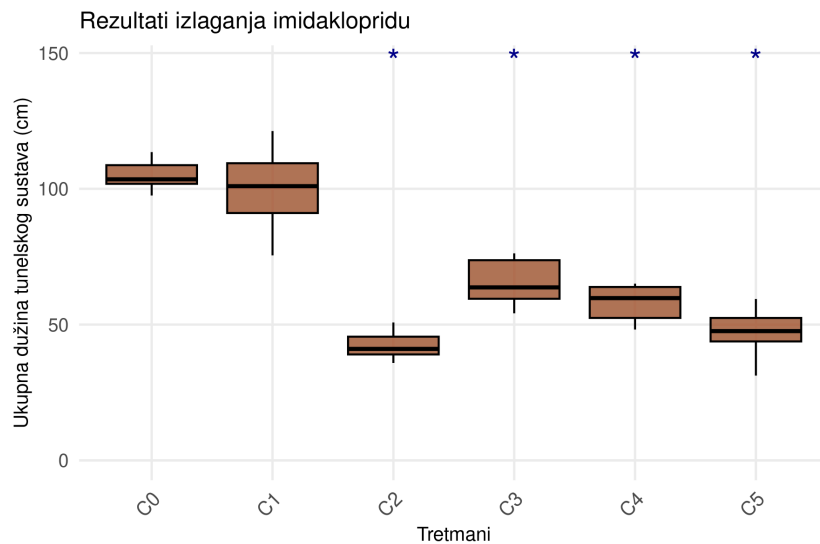
Slika 130. Utjecaj difenkonazola (DIF) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



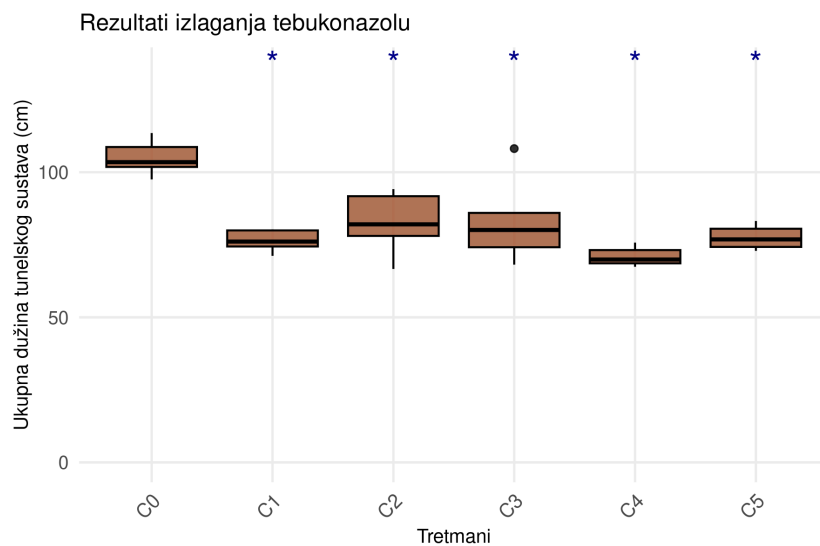
Slika 131. Utjecaj difenkonazola (DIF) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



Slika 132. Utjecaj glifosata (GLY) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



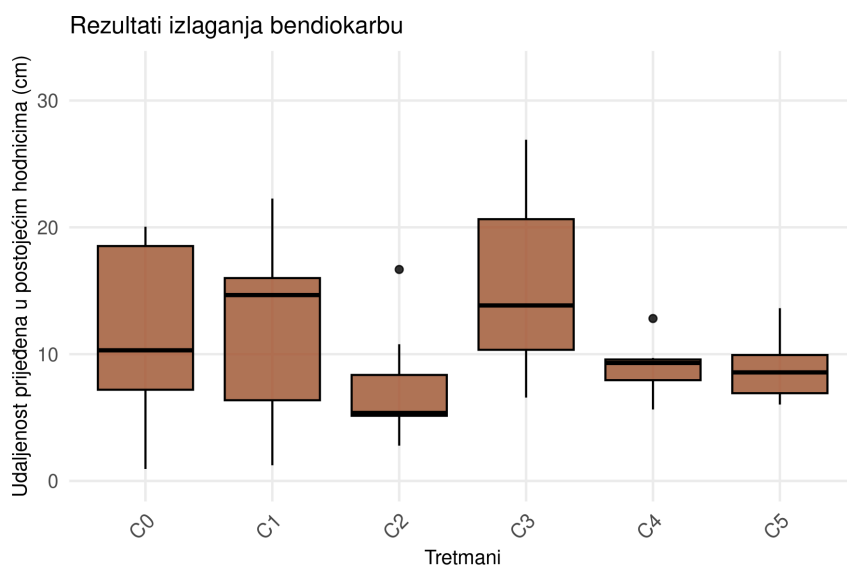
Slika 133. Utjecaj imidakloprida (IMI) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



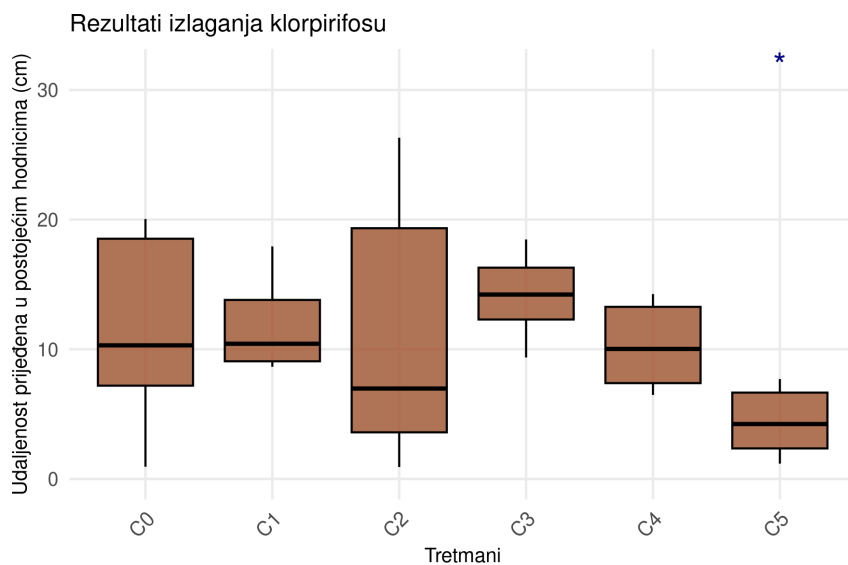
Slika 134. Utjecaj tebukonazola (TEB) na ukupnu dužinu tunelskog sustava. Na y-osi prikazana je ukupna dužina tunelskog sustava izražena u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

4.2.2.3. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na udaljenost prijeđenu u postojećim hodnicima

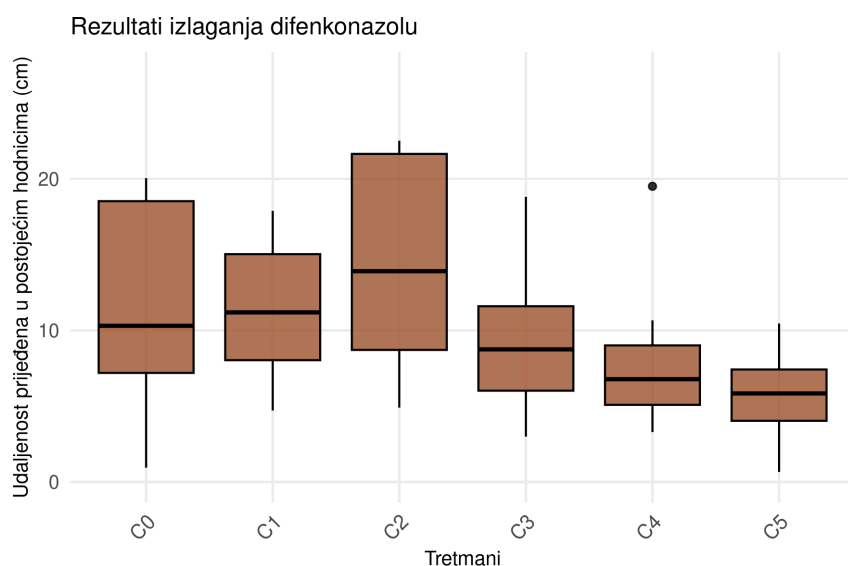
Analiza prijeđene udaljenosti unutar postojećih hodnika pokazala je značajnu razliku samo kod tretmana s CHP pri koncentraciji C5 ($p < 0,05$) (Slika 136). Kod svih drugih tretmana i koncentracija, nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (Slike 134 i 136-139).



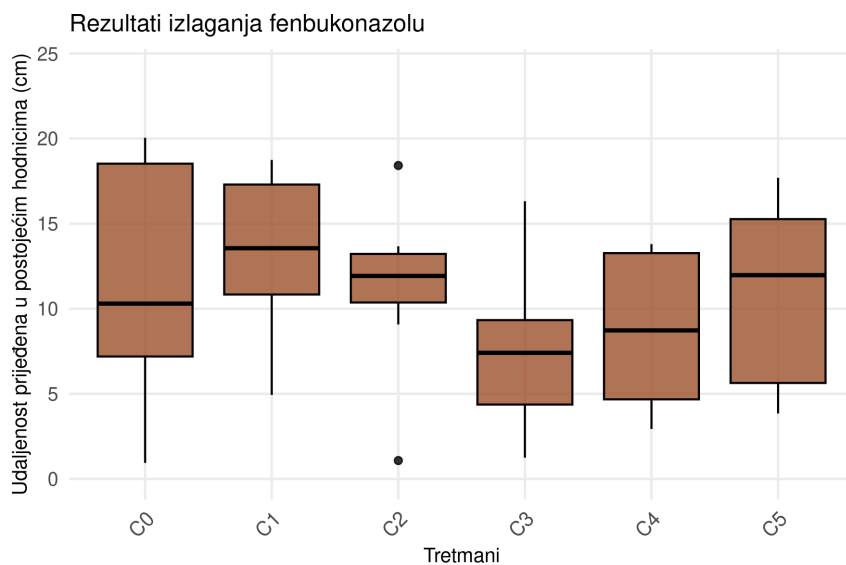
Slika 135. Utjecaj bendiokarba (BDC) na udaljenost prijeđenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijeđena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



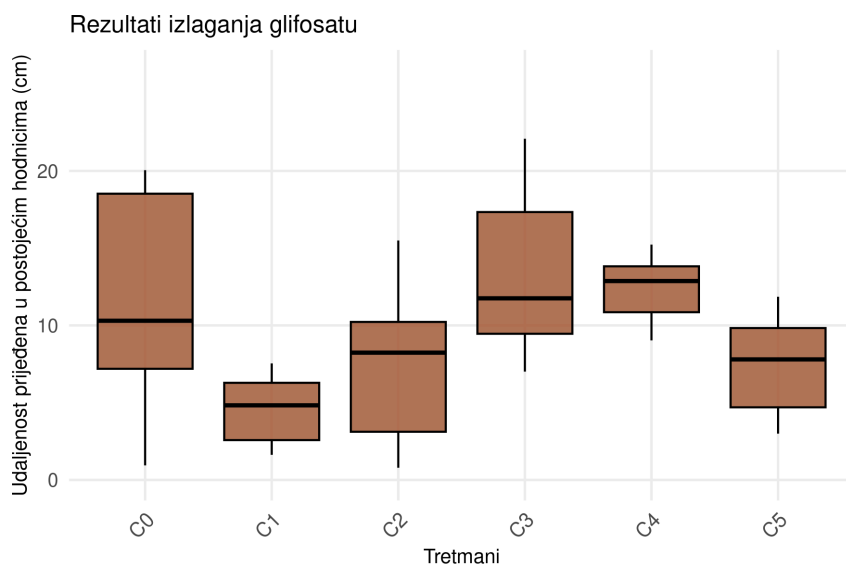
Slika 136. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na udaljenost prijeđenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijeđena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



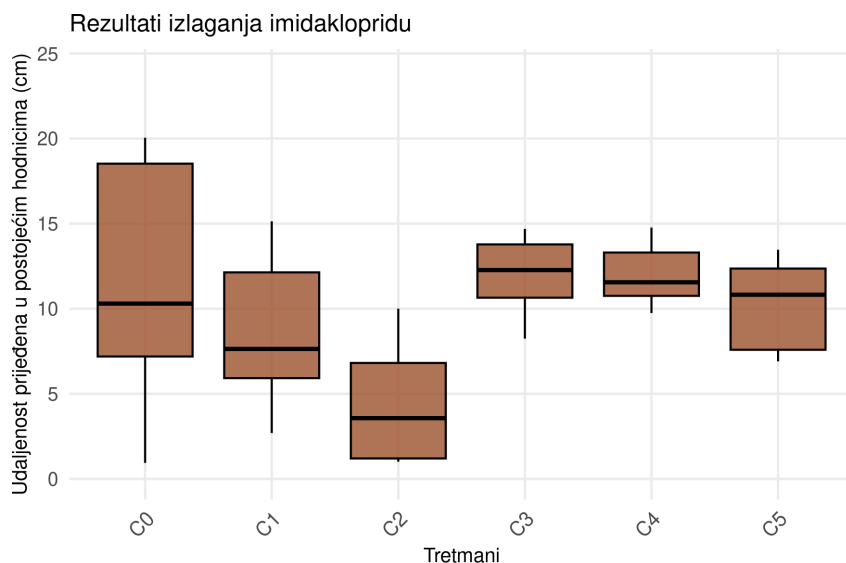
Slika 137. Utjecaj difenkonazola (DIF) na udaljenost prijeđenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijeđena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitim masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



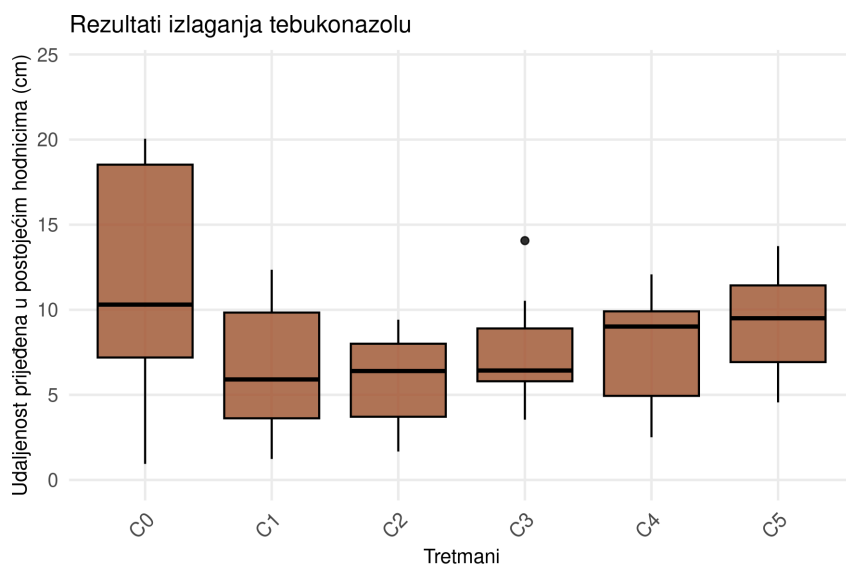
Slika 138. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na udaljenost prijedenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijedena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



Slika 138. Utjecaj glifosata (GLY) na udaljenost prijedenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijedena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



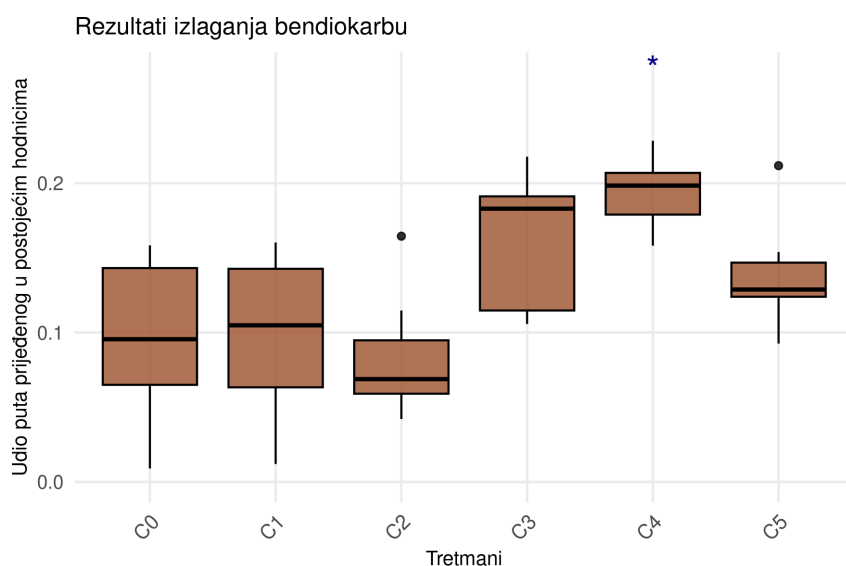
Slika 139. Utjecaj imidakloprida (IMI) na udaljenost prijedenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijedena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



Slika 140. Utjecaj tebukonazola (TEB) na udaljenost prijedenu u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazana je udaljenost prijedena u postojećim hodnicima u centimetrima (cm), dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

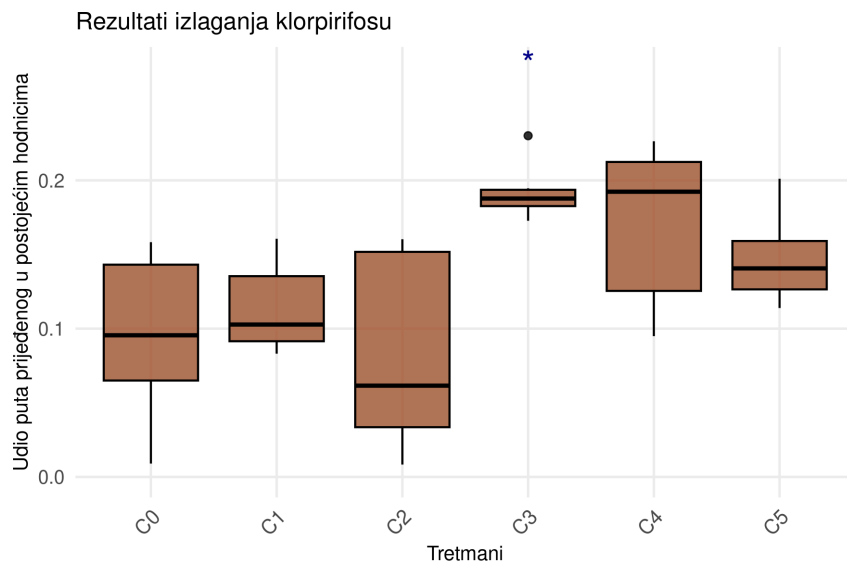
4.2.2.4. Utjecaj koncentracije zagađivala u tlu na udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima

Analiza udjela udaljenosti prijeđene u postojećim tunelima pokazala je statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,05$) za nekoliko tretmana. Kod tretmana s BDC, značajna razlika je utvrđena pri koncentraciji C4 (Slika 141).

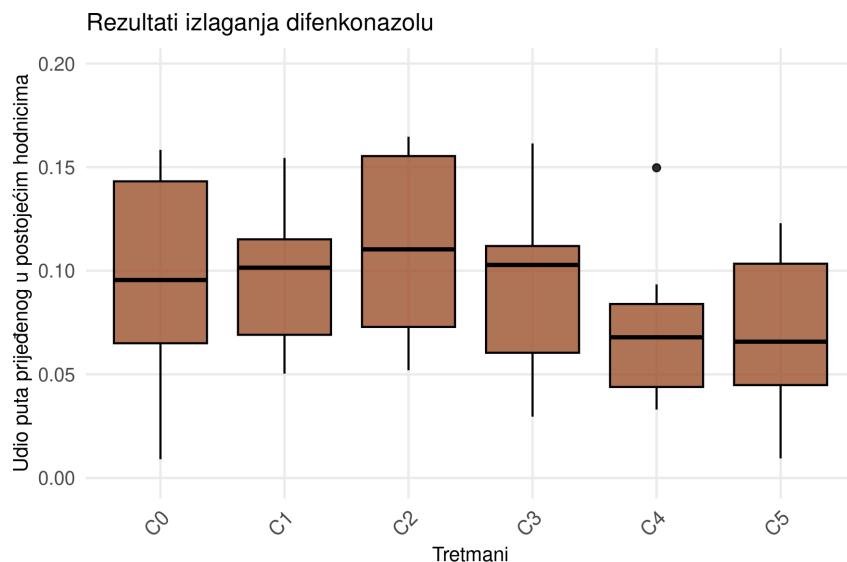


Slika 141. Utjecaj bendiokarba (BDC) na udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s BDC različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

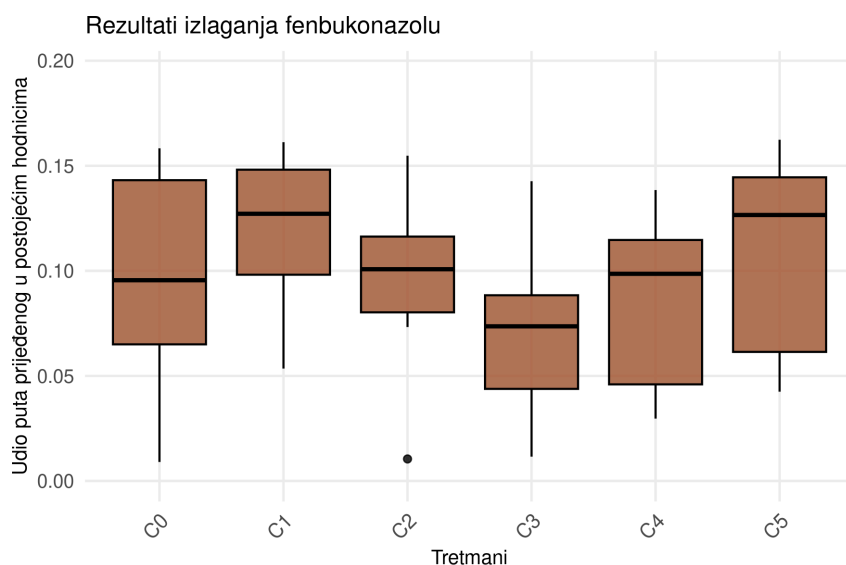
Kod tretmana s CHP, zabilježena je značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu pri koncentraciji C3 (Slika 142). Kod tretmana s GLY, značajna razlika je utvrđena pri koncentraciji C4 (Slika 145). U pokusu s IMI značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu utvrđene su pri koncentracijama C4 i C5 (Slika 146). Za ostale tretmane i koncentracije nije utvrđena značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (Slike 142, 143 i 146).



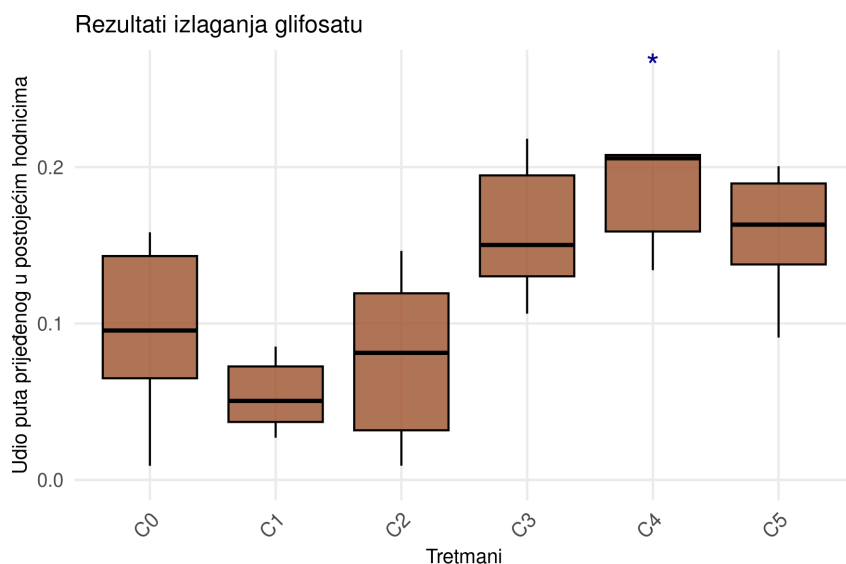
Slika 142. Utjecaj klorpirifosa (CHP) na udio puta prijednog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijednog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s CHP različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



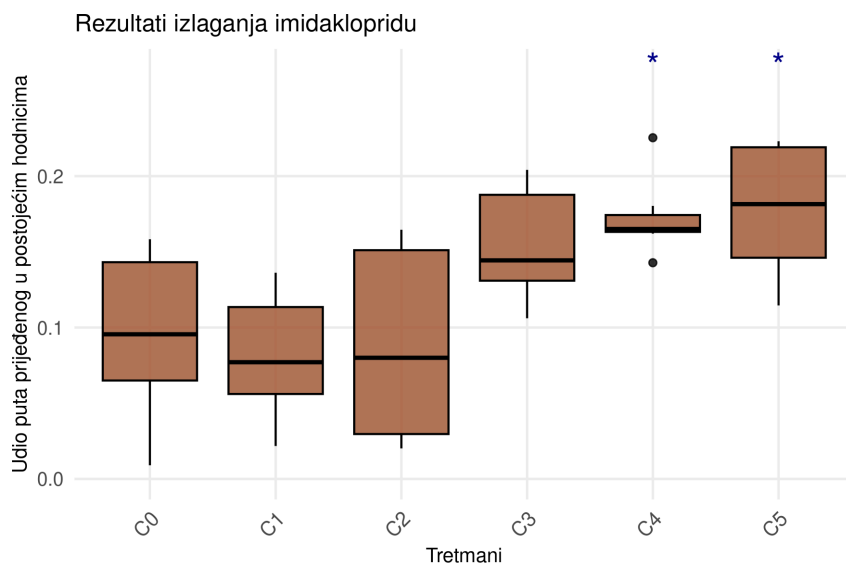
Slika 143. Utjecaj difenkonazola (DIF) na udio puta prijednog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijednog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s DIF različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



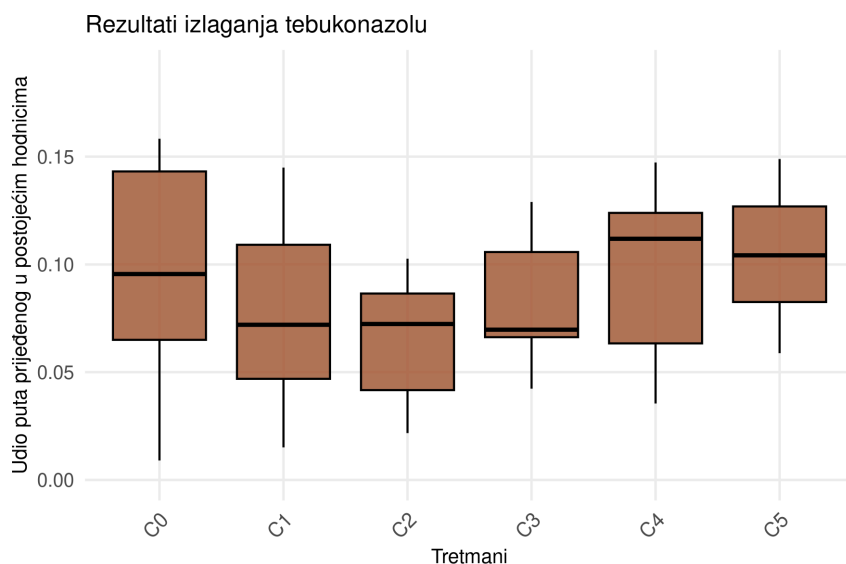
Slika 144. Utjecaj fenbukonazola (FEN) na udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s FEN različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



Slika 145. Utjecaj glifosata (GLY) na udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijeđenog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s GLY različitih masenih koncentracija u uzlaznom redosljedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



Slika 146. Utjecaj imidakloprida (IMI) na udio puta prijednog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijednog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s IMI različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.



Slika 147. Utjecaj tebukonazola (TEB) na udio puta prijednog u postojećim hodnicima. Na y-osi prikazan je udio puta prijednog u postojećim hodnicima, dok su na x-osi označene kontrolna grupa (C0) te grupe tretirane s TEB različitih masenih koncentracija u uzlaznom redoslijedu (C1-C5). Vrijednosti koncentracija koje odgovaraju naznačenim tretmanima sadržani su u poglavlju 3. Materijali i metode. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu naznačene su zvjezdicama iznad odgovarajućih kutija.

5. RASPRAVA

Parametri ponašanja vodenbuha prepoznati su kao osjetljivi biomarkeri izloženosti subletalnim koncentracijama raznih toksičnih tvari (Bownik, 2017), a brojne prednosti parametara ponašanja u procjeni rizika i regulaciji različitih kemikalija istaknute su u prethodnim istraživanjima (Ford i sur., 2021).

Ovo istraživanje pokazalo je povezanost između aktivnosti *D. magna* i koncentracija pesticida. Pojedinačne tvari pesticida inhibirale su aktivnost plivanja na način ovisan o dozi. Međutim, kod nekih pesticida je opažena stimulacija plivačke aktivnosti pri njihovim nižim koncentracijama. Iako statistički nije značajno, u eksperimentalnim grupama izloženim nižim koncentracijama triazolnih fungicida DIF, FEN i TEB (C1 i C2) zabilježen je blagi porast srednje brzine kretanja (v_{av}). Ovi rezultati mogu odražavati početno ponašanje bijega ili izbjegavanja vodenbuha, reakciju koja je u skladu s općom prilagodbom organizama na stres okoliša opisanu od strane Selye (1973) i teorijskim modelom ponašanja koji su predložili Ren i sur. (2009). Nakon ove početne stimulativne faze (tzv. alarmantno stanje), organizmi su vjerojatno prošli fazu aklimatizacije, što je dovelo do smanjenja plivačke aktivnosti. S druge strane, rezultati o plivačkoj aktivnosti vodenbuha izloženih višim koncentracijama pesticida upućuju na to da povećani pesticidni stres skraćuje trajanje početnih faza stresnog odgovora, koje najvjerojatnije nastupaju prije snimanja organizama (24 h). Stoga rezultati odražavaju toksični učinak viših koncentracija pesticida („iscrpljenost“) manifestiran inhibicijom ukupne plivačke aktivnosti, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja (Jeong i sur., 2014; Ren i sur., 2009; Zein i sur., 2015).

Iako su sve ispitivane tvari inducirale hipoaktivnost organizama na način ovisan o dozi, rezultati ukazuju na razlike u njihovoj potentnosti. S izrazito nižom EC50 vrijednosti prosječne brzine plivanja nakon 24 h izloženosti u usporedbi s EC50 vrijednostima ostalih pesticidnih formulacija, BDC je pokazao najveću potentnost među ispitivanim pesticidima ($13,35 \mu\text{g L}^{-1}$), nakon čega slijedi CHP ($0,27 \text{ mg L}^{-1}$). Obje klase pesticida inhibiraju AChE, ključni enzim za funkciju živčanog sustava, što dovodi do nakupljanja acetilkolina u sinaptičkoj pukotini i uzrokuje kontinuiranu stimulaciju živaca, paralizu te na kraju i smrt organizma (Casida i Durkin, 2013). Ovaj učinak primijećen je kod neciljnih organizama, uključujući *D. magna* (Barata i sur., 2004; Jeon i sur., 2013). Barata i sur. (2004) utvrdili su 50% inhibicije AChE pri koncentraciji $0,42 \mu\text{g L}^{-1}$ aktivne tvari (čistoća 99%) CHP nakon 48 h, dok su Vera-Herrera i sur. (2022) utvrdili djelomičnu inhibiciju AChE i smanjenje

pokretljivosti (smanjenje srednje brzine, akceleracije, indeksa pokretljivosti) pri koncentracijama oko $10 \mu\text{g L}^{-1}$ čiste aktivne tvari CHP nakon 48 h. Navedene koncentracije su niže ili približne najnižim koncentracijama CHP korištenim u istraživanju u okviru ove disertacije. Opažene razlike u odnosu na literature podatke najvjerojatnije su posljedica različitog djelovanja čiste aktivne tvari i korištene komercijalne formulacije, kao što je to opisano u Nagy i sur. (2019). Osim inhibicije AChE, Barata i sur. (2004) su također utvrdili inhibiciju aktivnosti karboksilesteraze (CbE) ovisnu o koncentraciji, slijedeći alosterni model propadanja koji opisuje razdoblje bez odgovora pri niskim koncentracijama, nakon čega slijedi ubrzani negativni odgovor s porastom koncentracije. Povezanost između razina AChE i plivačke aktivnosti kod vodenih organizama poput vodenbuha dobro je utvrđena u izloženosti organofosfatima (npr. Duquesne i Küster (2010) utvrdili su značajno smanjenje aktivnosti AChE, filtracijske aktivnosti i srednje brzine plivanja vodenbuha već pri koncentraciji $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ organofosfrantog pesticida paraokson metila, dok je u Printes i Callaghan (2004) 48-h EC50 za imobilizaciju $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ te 48-h IC50 za inhibiciju AChE $0,491 \mu\text{g L}^{-1}$ prilikom izlaganja vodenbuha CHP-u) i karbamatima (npr. Printes i Callaghan (2004) zabilježili su 48-h EC50 za imobilizaciju $0,0941 \text{mg L}^{-1}$ te 48-h IC50 za inhibiciju AChE $0,0538 \text{mg L}^{-1}$ prilikom izlaganja vodenbuha karbamatnom pesticidu propoksuru). AChE igra važnu ulogu u homeostazi ponašanja (Ren i sur., 2017). Inhibicija AChE pesticidima narušava normalnu neuromišićnu funkciju, što dovodi do smanjene brzine plivanja i promjene ponašanja. Ren i sur. (2017) primijetili su indukciju AChE na početku izloženosti, nakon čega je uslijedila inhibicija aktivnosti AChE, i otkrili su da smanjenje aktivnosti AChE za 50% može imati mjerljive toksične učinke na ponašanje. Štoviše, Jeon i sur. (2013) utvrdili su značajno smanjenje energetske rezervi u smislu smanjenja količine lipida i glikogena te povećanja sadržaja proteina već pri koncentraciji $0,113 \mu\text{g L}^{-1}$ karbamatnog pesticida karbarila (aktivna tvar), što je rezultiralo smanjenjem ukupnog energetskeg budžeta vodenbuha za 26%. Takvo smanjenje ukupnog energetskeg budžeta sugerira kako je poremećaj sustava alokacije energije mogao biti uzrokovan neizravno putem inhibicije AChE i potrošnje energije za sintezu novih enzima. Ovo iscrpljivanje energije korišteno za popravak oštećenja uzrokovanih zagađivačima moglo bi značiti nedovoljnu zalihu energije za normalnu plivačku aktivnost, što je primijećeno u ovom istraživanju.

U istraživanju u okviru ove disertacije opaženo je smanjenje aktivnosti vodenbuha (u vidu v_{av} , v_{frac} i MI) ovisno o dozi za sva tri testirana triazolska pesticida (TEB, DIF i FEN). Blaga stimulacija aktivnosti primijećena je pri niskim koncentracijama pesticida. To upućuje na to

kako se pri niskim koncentracijama pesticida energija koristi za izbjegavanje stresora, dok se pri višim koncentracijama pesticida energija koristi za mehanizme popravka i kataboličke reakcije, kao što je to opisano u literaturi (Cedergreen i sur., 2006; Sancho i sur., 2009). Prethodna istraživanja pokazala su kako kratkotrajna izloženost subletalnim koncentracijama TEB-a dovodi do smanjenja energetske rezervi (povećan katabolizam) i inhibicije ponašanja hranjenja kod vodenbuha. Sancho i sur. (2009) izmjerili su smanjenje ukupnog sadržaja proteina, smanjenje sadržaja lipida, značajno smanjenje sadržaja glikogena i smanjenje kalorijskog sadržaja zbog iscrpljivanja energetske rezervi, kod vodenbuha nakon 5 dana izloženosti subletalnim koncentracijama (0,41 - 1,14 mg L⁻¹) TEB-a. Ovi učinci bili su povezani s povećanom potrošnjom energije u uvjetima stresa i popravkom oštećenih stanica, tkiva i organa. Inhibitori demetilaze najvjerojatnije djeluju kao inhibitori enzima citokrom P450 uključenih u fazu I biotransformacije ksenobiotika kod kopnenih (Chalvet-Monfray i sur., 1996) i vodenih organizama (Cedergreen i sur., 2006), s napomenom o sinergijskim interakcijama između fungicida i određenih insekticida. Iako trenutno ne postoje podaci o neurotoksičnosti triazola kod vodenbuha, citotoksični eksperimenti su pokazali da 3-amino-1,2,4-triazol mijenja strukturu mitohondrija, osobito u metabolički aktivnijim tkivima poput tjelesnih mišića (Schultz i Kennedy, 1976). Smanjenje plivačke aktivnosti opaženo u ovom istraživanju stoga bi moglo biti rezultat nedovoljne sinteze ATP-a u mitohondrijima. Triazoli su također poznati kao inhibitori AChE (Tarikoğullari i sur., 2015), čija je uloga u homeostazi ponašanja već opisana ranije u prethodnom odlomku.

GLY je primarno dizajniran za ciljane biljke (npr. korove), ali dokumentiran je njegov utjecaj na neciljane vodene organizme poput vodenbuha kroz različite subletalne učinke. U istraživanju u okviru ove disertacije utvrđena je inhibicija brzine plivanja u ovisnosti o dozi kod vodenbuha izloženih pesticidu na bazi GLY-a, što je u skladu s nalazima prethodnih istraživanja, koja su zaključila kako GLY ima neurotoksične učinke koji ometaju motoričke funkcije. Primjerice, Cuhra i sur. (2013) su izvijestili kako je izloženost glifosatnim formulacijama dovela do smanjenja plivačke aktivnosti (u smislu imobilizacije organizama kvantificirane u okviru standardiziranog ekotoksikološkog testa), pri čemu je 48-h EC50 vrijednost imobilizacije za komercijalnu formulaciju Roundup iznosio je 22 mg L⁻¹, dok je EC50 za čistu aktivnu tvar GLY iznosio 31 mg L⁻¹. U istraživanju u okviru ove disertacije utvrđene su statistički značajne EC50 vrijednosti GLY za biheviorističke elemente v_{av} , MFL_{max} , NDC , MI , MFL_{av} i v_{max} u rasponu 11,3 - 14,7 mg L⁻¹, što su slične koncentracije onima u literaturi (Cuhra i sur., 2013).

U ovom istraživanju, IMI je pokazao najnižu potentnost, što je naznačeno s najvišom EC50 vrijednosti v_{av} među istraživanim pesticidima. To sugerira kako su potrebne veće koncentracije IMI-ja za postizanje sličnog učinka na brzinu plivanja vodenbuha u usporedbi s drugim pesticidima. Iako ova niža potentnost može implicirati smanjen neposredan učinak pri nižim koncentracijama, važno je razmotriti šire implikacije prisutnosti IMI-ja u okolišu. Osjetljivost vodenih organizama na imidakloprid pokazala je visoku varijabilnost, a prethodna istraživanja su pokazala visoku toleranciju *D. magna* na razne neonikotinoide, uključujući i IMI (Morrissey i sur., 2015). Li i sur. (2021) su istaknuli kako *D. magna* pokazuje visoku toleranciju na IMI zbog brze depuracije pesticida iz mekih tkiva, s poluživotom od približno 1,2 h, što rezultira niskom bioakumulacijom. Niža akutna potentnost zabilježena u istraživanju u okviru ove disertacije je u skladu s mehanizmom opisanim od strane Li i sur. (2020).

Toksičnost mješavina toksičnih tvari sličnog i različitog načina djelovanja na vrste vodenbuha ocijenjena je za širok raspon toksičnih tvari, pri čemu su imobilizacija i reprodukcija najčešće ocjenjivani krajnji parametri. Na primjer, Cedergreen i sur. (2006) su istražili sinergijske interakcije između imidazolnog fungicida prokloraza i određenih insekticida, herbicida i fungicida u 48-satnom testu imobilizacije. Naše istraživanje doprinosi ograničenom znanju o učincima mješavina na parametre ponašanja *D. magna* (Egan i sur., 2023; Zein i sur., 2015) i dokazuje kako se krajnji parametri ponašanja mogu koristiti kao polazna točka za dizajniranje pokusa s mješavinama. Prosječna brzina plivanja organizama daleko je najčešće ocjenjivan krajnji parametar ponašanja u ekotoksikološkim studijama s vrstama vodenbuha (Bownik, 2017). Stoga je u istraživanju u okviru ove disertacije taj parametar korišten za procjenu učinaka binarnih mješavina na ponašanje *D. magna* koristeći izoblografsku metodu.

Aditivni učinci primijećeni su u većini binarnih mješavina pesticida, a sinergijski učinci identificirani su samo u manjem broju mješavina pesticida, posebno u kombinacijama organofosfata (CHP i GLY), neonikotinoida (IMI) i mješavina s formulacijom na bazi karbamata (BDC) (tj. CHP x BDC, CHP x IMI, GLY x BDC, GLY x IMI, BDC x IMI). Sinergijske interakcije ukazuju na to da je kombinirani učinak pesticida veći od zbroja njihovih pojedinačnih učinaka. To je posebno zabrinjavajuće jer sugerira pojačanu toksičnost, koja može predstavljati značajne ekološke rizike. Prethodne studije dokumentirale su sinergijske učinke u mješavinama pesticida, ističući složenu prirodu kemijskih interakcija u vodenim okolišima. Tako je istraživanje Cedergreen i sur. (2008) pokazalo kako mješavine različitih klasa pesticida mogu rezultirati sinergijskom toksičnošću, s intenzivnijim utjecajem na vodene beskralješnjake nego što bi se očekivalo temeljem njihovih pojedinačnih učinaka.

Sinergijski učinak CHP-a i BDC-a na aktivnost vodenbuha u vidu srednje brzine kretanja može se objasniti na dva temeljna načina. Kao prvo, CHP nepovratno inhibira AChE, dok BDC to čini reverzibilno, što dovodi do produžene i pojačane disrupcije živčane funkcije kada se kombiniraju (Fukuto, 1990). Kao drugo, osim AChE-a, ovi pesticidi također mogu inhibirati druge ključne enzime uključene u esencijalne metaboličke procese, poput općih esteraza (GEs) i butirilkolinesteraze (BChE) (Barata i sur., 2004; Darvesh i sur., 2008). Inhibicija ovih enzima može poremetiti normalne fiziološke funkcije, pojačavajući njihove toksične učinke. Osim toga, energetski zahtjevi za suočavanje sa stresom uzrokovanim zagađivalima rastu (Gomes i sur., 2015), odvlačeći energiju od esencijalnih aktivnosti poput plivanja, što rezultira smanjenjem učinkovitosti plivanja i ukupne aktivnosti.

Rezultat sinergijskog učinka između CHP-a i IMI-ja s obzirom na brzinu plivanja vodenbuha dobiven u istraživanju u okviru ove disertacije u suprotnosti je s pretežno antagonističkim interakcijama opisanim u Loureiro i sur. (2010), temeljem istraživanja kombiniranih učinaka IMI-ja i CHP-a na stope imobilizacije i hranjenja. Mogući razlog odstupanja rezultata izmjerenih u okviru ovog istraživanja od literaturnih podataka je različito djelovanje čistih aktivnih tvari (korištene u Loureiro i sur. (2010)) i komercijalnih formulacija pesticida (korištene u istraživanju u okviru ove disertacije). Sinergizam zabilježen u istraživanju u okviru ove disertacije implicira kako CHP i IMI djeluju na različite dijelove živčanog sustava. CHP inhibira AChE, dok IMI djeluje kao agonist nAChR-a, što rezultira stalnom stimulacijom i blokadom sinaptičke transmisije (Morrissey i sur., 2015). Kombinacija ovih mehanizama vjerojatno dovodi do povećane neurotoksičnosti koja je veća od zbroja pojedinačnih učinaka. Rezultat je pojačano narušavanje motoričkih funkcija, čime se značajno smanjuje brzina plivanja (Hussain i sur., 2020). Slično tome, mješavina BDC-a i IMI-ja je rezultirala sinergijskim smanjenjem prosječne brzine plivanja vodenbuha zbog djelovanja na različite dijelove živčanog sustava, kao što je opisano za mješavinu CHP-a i IMI-ja.

Sinergijski učinak mješavine GLY-a i BDC-a zabilježen u istraživanju u okviru ove disertacije može se objasniti različitim mehanizmima djelovanja koji ciljaju različite fiziološke procese. GLY je herbicid koji inhibira enzim EPSPS (5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza) u biljnom metabolizmu, dok BDC inhibira AChE u živčanom sustavu. Prethodna istraživanja izvijestila su o neurotoksičnim učincima GLY koji ometaju motoričke funkcije vodenbuha (npr. Cuhra i sur. (2013)), stoga je prisutnost ovog pesticida vjerojatno oslabio organizam i učinio ga još osjetljivijim na neurotoksične učinke BDC-a, što je moglo dovesti do opaženog sinergijskog učinka. U literaturi nisu pronađeni podaci o učinku mješavina GLY i BDC na vodenbuhe niti

druge organizme, stoga istraživanje u okviru ove disertacije donosi vrijedne nove spoznaje u ovom području te potiču na daljnja istraživanja koja bi mogla detaljnije objasniti mehanizme interakcija između različitih klasa pesticida i njihove kumulativne učinke na vodene ekosustave.

Iako u literaturi nisu pronađeni podaci o djelovanju mješavina GLY-a i IMI-a na vodenbuhe ili druge organizme, opaženi sinergistički učinak mješavina ova dva pesticida najvjerojatnije je nastupio uslijed kombiniranih učinaka oksidativnog stresa i neurotoksičnosti. IMI djeluje kao agonist nAChR-a i time je uzrokom neurotoksičnosti, dok GLY može smanjiti ukupnu otpornost organizma na stres induciranjem oksidativnog stresa i na taj način povećati njegovu osjetljivost na neurotoksične učinke IMI-ja (Li i sur., 2020).

Aditivni učinci izmjereni su u svim ostalim mješavinama pesticida. Mješavine fungicida na bazi triazola slijedile su koncentracijsku adiciju, točno kao što se očekivalo prema teoriji „jednakog načina djelovanja” (Bliss, 1939; Syberg i sur., 2008). Istraživanje u okviru ove disertacije utvrdilo je aditivni učinak IMI-ja i fungicida na bazi triazola na vodenbuhe, što je u skladu s istraživanjima Man i sur. (2023), koji su otkrili kako kombinacija imidakloprida i TEB-a (triazolni fungicid) općenito odgovara modelu neovisnog djelovanja (eng. *independent action*, IA), ukazujući na adiciju. Man i sur. (2023) primijetili su kako aditivni učinak može biti varijabilan, pokazujući sinergizam pri niskim dozama i antagonizam pri visokim dozama (iznad četiri puta veće koncentracije od EC50). Koncentracije IMI i TEB korištene u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije slične su onima korištenim u Man i sur. (2023), dok je razlika u obliku pesticida; Man i sur. koristili su čiste aktivne tvari, dok su u ovom istraživanju korištene komercijalne formulacije pesticida, što može biti razlog odstupanja rezultata ovog istraživanja od literaturnih podataka. Zabilježeni rezultat sugerira kako dinamika interakcije može ovisiti o razinama koncentracije. Rezultati ove doktorske disertacije, koji su pokazali kako većina binarnih mješavina pesticida slijedi adiciju u smanjenju brzine plivanja vodenbuha, u skladu su s rezultatima prikazanim u Schell i sur. (2018), gdje je ocijenjena prikladnost modela koncentracijske adicije (eng. *concentration addition*, CA) za predviđanje učinaka mješavina pesticida na *D. magna*.

U zadnjih nekoliko godina naglašava se potreba korištenja TK-TD modela za simulaciju fizioloških procesa koji nastaju kao rezultat izloženosti pojedinačnim toksičnim tvarima i njihovim mješavinama (Bart i sur., 2021; Matyja, 2023). Na koji način promjene u ponašanju odražavaju poremećaje u raspodjeli energije i moguće preusmjerenje energije u procese koji

održavaju homeostazu i štite organizam od štetnih učinaka toksičnih tvari prikazano je u radovima Sancho i sur. (2009) i Cedergreen i sur. (2017), u kojima je utvrđeno kako se većina testiranih mješavina pesticida uklapa u CA model, demonstrirajući adicijske učinke. Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije pružaju dodatne uvide u skladu s prijašnjim rezultatima te omogućavaju stvaranje realističnijih modela i simulacija kratkoročnih i dugoročnih učinaka zagađivala na individualnoj razini, populacijskoj razini i na razini ekosustava.

Rezultati jednoznačno pokazuju kako EC50 za srednju brzinu plivanja može poslužiti kao temelj za dizajn pokusa utjecaja mješavina zagađivala na *D. magna*, ne samo kao inovativni pristup za procjenu subletalnih učinaka odabranih formulacija pesticida, već i kao pokazatelj potencijalne primjenjivosti ove metodologije na širi raspon pesticida. Ovaj je rezultat posebno značajan s obzirom na relativno ograničeno razumijevanje utjecaja mješavina pesticida, u odnosu na razumijevanja pojedinačnih tvari, na ponašanje vodenih organizama. Korištenje EC50 kao temelja za eksperimentalni dizajn usklađeno je s potrebom za standardiziranim i osjetljivim markerima u toksikološkim istraživanjima, jer omogućava procjenu kombiniranih učinaka više pesticida na ponašanje vodenbuha (Melvin i Wilson, 2013). Nadalje, uključivanje ponašanja plivanja kao subletalnog krajnjeg parametra u testiranje toksičnosti pruža vrijedne uvide u ekološke učinke mješavina pesticida na vodene organizme (Lovern i sur., 2007). Ovaj pristup ključan je za razumijevanje subletalnih učinaka mješavina pesticida, koji mogu imati značajne ekološke implikacije, posebno u kontekstu okolišnih stresora i složenih izlaganja kemijskim tvarima u vodenim ekosustavima (Egan i sur., 2023).

Osjetljivost biheviorističkih elemenata na subletalne toksične učinke ujedno naglašava i njihov ekološki značaj. Korištenje EC50 za prosječnu brzinu plivanja kao metrike u studijama toksičnosti mješavina predstavlja metodološku inovaciju, nudeći detaljniji pogled na učinke zagađivala koji može nadopuniti standarde temeljene na mortalitetu i parametrima reprodukcije. Pokazujući aditivne i sinergijske učinke binarnih mješavina pesticida na brzinu plivanja *D. magna*, ovo istraživanje naglašava važnost uključivanja biheviorističkih elemenata, a posebno testiranja toksičnosti mješavina na biheviorističke elemente, u okvire za procjenu rizika, što je u skladu s preporukama iznesenim u radu Ford i sur. (2021).

Rezultati analize osobina neuronske mreže, analizirani kroz 50 iteracija, ukazuju na visoku stabilnost i pouzdanost ovog pristupa za klasifikaciju izloženosti vodenbuha različitim zagađivalima. Prosječna točnost modela (34,72%) odražava izazovnu prirodu problema s obzirom na kompleksnost podataka i višeklasni karakter klasifikacije. Ipak, visoke vrijednosti

uravnotežene točnosti (92,80%), prosječne preciznosti (86,22%), osjetljivosti (86,00%) i specifičnosti (99,59%) pokazuju kako model uspješno uočava razlike između klasa i održava ravnotežu između prepoznavanja pozitivnih i negativnih uzoraka. Ovakav pristup pruža značajne prednosti u ekotoksikološkim istraživanjima, osobito kada je riječ o analizama velikih i složenih skupova podataka. Primjena dubokog učenja omogućava automatizaciju analize i smanjenje subjektivnih pogrešaka, koje su često prisutne u tradicionalnim metodama analize biheviorističkih podataka. Nadalje, sposobnost mreže da uoči uzorke i povezanosti unutar visokodimenzionalnih podataka otvara mogućnost detekcije suptilnih promjena u ponašanju vodenbuha koje mogu biti povezane s izlaganjem niskim koncentracijama zagađivala. Primjena ovakvog modela u ekotoksikološkim istraživanjima ima potencijal za unapređenje procjena rizika, posebice kroz detekciju ranih znakova stresa organizama u laboratorijskim ili terenskim uvjetima. Integracija algoritama poput obrade prirodnog jezika (eng. *natural language processing*, NLP) sa standardnim bioanalitičkim pristupima može dodatno doprinijeti boljoj interpretaciji biheviorističkih odgovora i njihovom povezivanju s ekološki relevantnim učincima. Međutim, potrebno je uzeti u obzir i određena ograničenja ovog pristupa, kao što su osjetljivost modela na izbor hiperparametara, te kvaliteta i reprezentativnost ulaznih podataka, kao i potencijalne izazove u skaliranju ovog pristupa na druge vrste organizama ili različite scenarije izloženosti. Unatoč tim izazovima, rezultati dobiveni u okviru ove disertacije ukazuju na veliki potencijal dubokog učenja kao alata za pouzdanu klasifikaciju složenih biheviorističkih podataka u ekotoksikološkim istraživanjima, s mogućnošću daljnjeg razvoja i prilagodbe za specifične potrebe različitih aplikacija u zaštiti okoliša. Buduća istraživanja trebala bi se orijentirati na evaluaciju ovakvog pristupa u širem kontekstu, uključujući terenske uvjete i primjenu na druge organizme, kako bi se dodatno procijenila njegova primjenjivost i generalizacija.

Rezultati provedenog istraživanja otvaraju nove mogućnosti za istraživanje utjecaja zagađivala na ponašanje, sugerirajući kako buduće studije trebaju istražiti širi raspon krajnjih parametara ponašanja i sastava mješavina. Štoviše, doprinosom razvoju sofisticiranih metodologija procjene rizika, rezultati ove disertacije imaju potencijal informiranja ekoloških politika i regulatornih okvira, u svrhu zalaganja za sveobuhvatnijom procjenom učinaka zagađivala na vodene ekosustave.

Ponašanje gujavica prepoznato je kao osjetljiv biomarker izloženosti organizama subletalnim koncentracijama zagađivala prisutnih u okolišu (Capowiez i sur., 2003). U istraživanjima ponašanja i ekoloških karakteristika gujavica najčešće se koriste optičke metode za bilježenje

aktivnosti, kao što su snimanje digitalnim kamerama ili ručno praćenje njihovih putanja. Ova istraživanja često se fokusiraju na razmnožavanje (Nuutinen i Butt, 1997), aktivnost na površini tla (Valckx i sur., 2010), hranjenje (Griffith i sur., 2013) te disperziju organizama u tlu (Caro i sur., 2012). Iako su već razvijeni neki automatski sustavi (Valckx i sur., 2010) koji postupno zamjenjuju ručnu analizu snimaka ponašanja (Nuutinen i Butt, 1997), i dalje postoji potreba za razvojem metoda koje omogućavaju automatsku i objektivnu kvantifikaciju aktivnosti organizama ukopanih u tlu. Za ove svrhe sve se češće primjenjuju metode koje koriste gama- i rendgensko zračenje (Capowiez i sur., 2011; Joschko i sur., 1993), dok je među novijim metodama procjena aktivnosti gujavica pomoću detekcije promjena u generiranom električnom polju uzrokovanih kretanjem organizama unutar komore s tlom (Rastetter i Gerhardt, 2018). Inovativni pristupi temeljeni na računalnom vidu te strojnom i dubokom učenju razvijeni i primijenjeni u istraživanju provedenom u okviru ove disertacije doprinosi daljnjem razvoju preciznijih, učinkovitijih i manje invazivnih metoda za praćenje i analizu ponašanja gujavica u različitim uvjetima.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajne promjene u ponašanju gujavica pod utjecajem svih ispitivanih pesticida, pri čemu su utvrđene razlike između tretiranih grupa i kontrolne grupe, i između vremenskih točaka od 24 sata i 48 sati. Rezultati pokazuju da je kod većine ispitivanih pesticida srednja brzina kretanja gujavica pokazivala silazni trend s povećanjem koncentracije zagađivala, što je u skladu s rezultatima Siregar i sur. (2024), gdje je sličan učinak utvrđen i za neke neonikotinoide, uključujući IMI, pri koncentracijama 1-10 ppb u okviru filter papir testa. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu u istraživanju u okviru ove disertacije bile su najčešće prisutne pri višim koncentracijama pesticida (C4 i C5), dok su razlike između 24 i 48 sata bile prisutne kod većine koncentracija. Ovi rezultati ukazuju na inhibitorni učinak viših koncentracija zagađivala na motoričku funkciju, što je uočeno i u drugim studijama (Capowiez i sur., 2003; Nuutinen i Butt, 1997), a istovremeno ukazuju na progresivan utjecaj izloženosti tijekom vremena (Tiwari i sur., 2016). Korelacija između povećanja koncentracije pesticida i smanjenja brzine kretanja može biti indikator mehanizama toksičnog djelovanja pesticida na živčani sustav gujavica, sugerirajući da pesticidi mogu ometati neurotransmisiju, što dovodi do smanjene motoričke aktivnosti. Ovakvi učinci opisani su u ranijim istraživanjima koja su pokazala kako pesticidi mogu utjecati na aktivnost AChE i druge neurološke putove (Griffith i sur., 2013; Valckx i sur., 2010), što je rezultiralo neuromuskularnim poremećajima i u konačnici promjenama u ponašanju gujavica. Relativno vrijeme koje gujavice provode uz rub značajno se mijenjalo

pod utjecajem pesticida. U većini slučajeva, veće koncentracije pesticida rezultirale su duljim vremenom provedenim uz rub eksperimentalne posude (Petrijeve zdjelice), što sugerira povećanu anksioznost ili poremećaj u normalnom obrascu kretanja. Ovaj bihevioristički element bio je posebno osjetljiv na pesticide GLY, IMI i BDC, pri čemu su zabilježene značajne razlike već pri nižim koncentracijama. Budući kako udio vremena proveden uz rub posude novi bihevioristički element, dobivene rezultate nije moguće usporediti sa sličnim podacima iz literature. Kretanje unatrag također je pokazalo promjene ovisne o koncentraciji pesticida. Kod većine tretmana zabilježeno je povećanje ovog ponašanja pri višim koncentracijama, što može ukazivati na pokušaje izbjegavanja neugodnih podražaja. Primjerice, kod pesticida DIF, IMI i FEN razlike su bile posebno izražene pri koncentracijama C4 i C5, što upućuje na pokušaj izbjegavanja zagađenog medija. Indeks pokretljivosti (*MI*), koji predstavlja udio vremena provedenog u kretanju, također se značajno razlikovao između tretiranih i kontrolnih grupa. Kod pesticida TEB, DIF i CHP uočeno je smanjenje *MI* pri većim koncentracijama, uz izražen pad nakon 48 sati, što ukazuje na kumulativni učinak izloženosti. Ovakav rezultat je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja, a može ukazivati na povećani energetske trošak organizama uslijed izloženosti pesticidima, što može dovesti do općeg smanjenja aktivnosti. Ove promjene mogu biti posljedica metaboličkog troška ili oštećenja živčanog sustava uzrokovanog izloženosti pesticidima (Siregar i sur., 2024). Broj podizanja prostomija, koji je korišten kao indikator pokušaja bijega ili poremećaja u ukupnoj aktivnosti, pokazao je značajne promjene ovisno o vrsti i koncentraciji pesticida. Najveće vrijednosti ovog biheviorističkog elementa zabilježene su pri srednjim i višim koncentracijama GLY, IMI i BDC nakon 24 sata, dok su nakon 48 sati neke grupe pokazale smanjenje ovog ponašanja, što može ukazivati na iscrpljenost organizma ili prilagodbu na stres. Kako je riječ o novom biheviorističkom biomarkeru za koji nisu utvrđeni rezultati prethodnih istraživanja, dobivene rezultate nije bilo moguće usporediti s podacima iz literature, no mogu poslužiti kao temelj ili referenca za buduća istraživanja u ovom području.

Rezultati modificiranog filter papir testa pokazuju kako se odgovor gujavica na pesticide razlikuje ovisno o vrsti pesticida, koncentraciji i trajanju izlaganja. Značajne razlike između 24-satnog i 48-satnog izlaganja ukazuju na to kako vremensko trajanje izlaganja ima ključnu ulogu u određivanju intenziteta promjena u ponašanju. U nekim slučajevima, gujavice su pokazale znakove prilagodbe nakon 48 sati, dok je u drugim slučajevima zabilježen daljnji pad aktivnosti, što upućuje na iscrpljenost ili nemogućnost prilagodbe na stresor. Neki pesticidi mogu izazvati akutne toksične učinke koji se brzo manifestiraju unutar prvih 24 sata,

dok drugi možda ne pokazuju značajne učinke dok se ne akumuliraju dovoljne koncentracije ili dok ne dođe do njihove metaboličke aktivacije. Na primjer, istraživanja koja su proučavala učinke neonikotinoidnih pesticida na gujavice pokazuju kako dugotrajnije izlaganje može rezultirati smanjenom lokomotoričkom aktivnošću (srednja brzina) i povećanjem perioda odmora (smanjenje indeksa pokretljivosti) (Siregar i sur., 2024). Osim toga, u istraživanju u okviru ove disertacije utvrđeno je kako se u nekim slučajevima gujavice prilagođavaju na prisutnost pesticida nakon 48 sati, što može ukazivati na aktivaciju mehanizama detoksikacije ili prilagodbu na stresor (Ågerstrand i sur., 2020). S druge strane, kod nekih pesticida zabilježen je daljnji pad aktivnosti, što može ukazivati na iscrpljenost ili nemogućnost adekvatne prilagodbe organizama na visoke koncentracije ili kontinuirano izlaganje stresoru. Takvi nalazi mogu sugerirati potencijal za kroničnu toksičnost određenih pesticida (Truhaut, 1977).

Rezultati pokusa u kojima su organizmi bili izloženi u tlu pokazali su značajna odstupanja u ponašanju gujavica izloženih višim koncentracijama pesticida u usporedbi s kontrolnom skupinom, pri čemu su najizraženije razlike izmjerene u prijeđenoj udaljenosti, odnosno ukupnom prijeđenom putu. Primjerice, kod tretmana s BDC-om ukupno prijeđeni put bio je značajno manji pri koncentracijama C2, C4 i C5, dok je GLY rezultirao značajnim smanjenjem ukupno prijeđenog puta pri svim koncentracijama. Tretman s IMI-om pokazao je značajno smanjenje prijeđenog puta pri koncentracijama C2-C5, dok se kod najniže koncentracije (C1) nije uočila statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovakvi rezultati ukazuju na snažan učinak istraživanih pesticida na lokomotorne funkcije gujavica, posebno pri višim koncentracijama.

Osim toga, analiza specifičnih elemenata ponašanja unutar postojećih tunelskih struktura otkrila je promjene u biheviorističkim obrascima kod tretmana s CHP-om pri najvišoj koncentraciji (C5), dok kod drugih tretmana i koncentracija nije uočena statistički značajna razlika. Takvi obrasci ponašanja mogu se djelomično objasniti poznatim mehanizmima djelovanja pesticida. Inhibitori AChE, kao što je npr. klorpirifos, ometaju neurotransmisiju, što može rezultirati promjenama u motoričkim funkcijama i ponašanju organizma. Korelacija između inhibicije AChE i biheviorističkih odgovora gujavica već je utvrđena u ranijim istraživanjima (Yadav i sur., 2020), što dodatno potvrđuje kako bihevioristički elementi mogu poslužiti kao pouzdani indikatori neurotoksičnosti u ekotoksikološkim istraživanjima.

Rezultati iznijeti u ovoj disertaciji ističu važnost praćenja biheviorističkih odgovora kao indikatora ekotoksikološkog utjecaja. Ponašanje gujavica, kao modelnog organizma, omogućava procjenu subletalnih učinaka pesticida te pruža dodatne informacije koje nadopunjuju tradicionalne biokemijske i fiziološke pokazatelje toksičnosti. Pristupi koji uključuju biheviorističke analize mogu omogućiti ranije prepoznavanje stresnih učinaka te poslužiti u svrhu procjene rizika i zaštite ekosustava. Koncentracije pesticida korištene u ovom istraživanju veće su od onih koje se obično nalaze u nezagađenim i slabo zagađenim okolišima, gdje su najčešće izmjerene vrijednosti u mikrogramima po litri ($\mu\text{g L}^{-1}$) u vodenim sustavima i mikrogramima po kilogramu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) u sedimentima, a slične koncentracije prisutne su i u tlima. Korištenje ovakvih koncentracija omogućilo je prikupljanje novih spoznaja, posebice za laboratorijska istraživanja, gdje se simuliraju uvjeti visokog onečišćenja kako bi se procijenili potencijalni učinci pesticida pod ekstremnim uvjetima. Ovo je ključno za razvoj strategija mitigacije i poboljšanja regulativa za zaštitu okoliša, dajući uvid u moguće scenarije rizika koje bi teže bilo procijeniti samo na temelju podataka iz slabije zagađenih okoliša (Ford i sur., 2021).

6. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni istraživanjima u okviru ove disertacije prije svega ističu važnost praćenja biheviorističkih odgovora kao osjetljivih biomarkera subletalnih učinaka pesticida na vodene beskralježšnjake i gujavice, koji su ključni modelni organizmi u ekotoksikološkim istraživanjima vodenih i kopnenih sustava. Dobiveni podaci doprinose razumijevanju utjecaja pesticida i njihovih mješavina na pojedine elemente ponašanja, što može imati značajne implikacije za procjenu rizika izloženosti zagađivalima. Najvažniji zaključci proizašli iz ovog istraživanja su:

- Istraživani pesticidi imaju značajan utjecaj na biheviorističke elemente vodenbuha, pri čemu niže koncentracije izazivaju blagu stimulaciju kao dio početne adaptivne reakcije, dok veće koncentracije uzrokuju inhibiciju aktivnosti uslijed iscrpljenosti organizma.
- EC50 vrijednosti, kao ključni parametri toksičnosti, ukazale su na različitu potentnost pesticida. Primjerice, BDC i CHP pokazali su najveći utjecaj na ponašanje vodenbuha, vjerojatno jer inhibiraju AChE, enzim koji je ključan za neuromišićnu funkciju.
- Kod vodenbuha pesticidi CHP i BDC bili su najpotentniji na parametar srednja brzina kretanja, dok je za ostale spojeve utvrđena manja potentnost.
- Za određene nove biheviorističke element vodenbuha (prosječna frakcijska brzina i prosječna duljina frakcija kretanja) utvrđeni su jednoznačne promjene ovisne u dozi zagađivala te statistički značajne EC50 vrijednosti nakon 24 i 48 sata izloženosti.
- Novo uvedeni bihevioristički elementi vodenbuha, poput indeksa promjene smjera nakon odmora, prosječne frakcijske brzine i prosječne duljine frakcija kretanja, visoko su korelirani s tradicionalnim elementima poput srednje brzine, indeksa pokretljivosti i broja promjena smjera.
- Sinergijski učinci mješavina pojedinih pesticida kod vodenbuha, poput onih koji su sadržavali CHP ili BDC, dodatno naglašavaju složenost kemijskih interakcija u vodenim ekosustavima. Ti učinci ukazuju na povećanu toksičnost mješavina u odnosu na njihove pojedinačne učinke, što predstavlja poseban ekološki rizik.
- Izloženost gujavica pesticidima uzrokovala je značajne promjene u lokomotornim funkcijama, pri čemu su najveći učinci uočeni kod viših koncentracija pesticida. Na primjer, GLY je pri svim testiranim koncentracijama značajno smanjio ukupno prijedeni put, dok je kod većine testiranih pesticida utvrđena ovisnost učinka o dozi,

dok je izloženost gujavica CHP-u uzrokovala značajne promjene u ukupnoj prijeđenoj udaljenosti i udjelu puta prijeđenog u postojećim hodnicima.

- Primjena neuronskih mreža u analizi podataka o ponašanju organizama pokazala je visoku točnost i pouzdanost u klasifikaciji izloženosti pesticidima, uz prosječnu uravnoteženu točnost modela od 92,80%. Upotreba visokosofisticiranih neuronskih mreža i dubokog učenja omogućava detekciju suptilnih promjena u ponašanju, pružajući nove alate za procjenu toksičnosti u laboratorijskim i terenskim istraživanjima.
- Dokazano je da koncentracija i trajanje izloženosti vodenbuha i gujavica zagađivalima značajno utječu na biheviorističke elemente.
- Različiti bihevioristički elementi razlikuju se u osjetljivosti na pesticide.
- Istraživanje pruža značajan znanstveni doprinos u ekotoksikologiji kroz kvantifikaciju standardnih i uvođenje novih biheviorističkih elemenata kao osjetljivih biomarkera.
- Dobiveni rezultati naglašavaju važnost elemenata ponašanja kao biomarkera u procjeni rizika zagađivala, jer pružaju dodatne informacije kao korisnu nadopunu biokemijskih i fizioloških pokazatelja.
- Rezultati također pružaju temelj za razvoj realističnijih modela i simulacija za predviđanje kratkoročnih i dugoročnih učinaka zagađivala na razini jedinki i ekosustava.
- Istraživanje otvara mogućnosti za razvoj sofisticiranijih metoda procjene rizika koje uključuju biheviorističke elemente kao ključne indikatore toksičnosti.
- Preporučuje se uključivanje novih biheviorističkih elemenata u buduće istraživačke protokole.
- Potrebno je proširiti istraživanja na širi spektar pesticida i krajnjih parametara ponašanja, uključujući procjene dugoročnih učinaka.

POPIS LITERATURE

1. Abdullahi, M., Li, X., Abdallah, M. A.-E., Stubbings, W., Yan, N., Barnard, M., Guo, L.-H., Colbourne, J. K., Orsini, L. (2022). *Daphnia* as a Sentinel Species for Environmental Health Protection: A Perspective on Biomonitoring and Bioremediation of Chemical Pollution. *Environmental Science & Technology*, 56(20), 14237–14248. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01799>
2. Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36–42. https://imagej.net/ij/docs/pdfs/Image_Processing_with_ImageJ.pdf
3. Ågerstrand, M., Arnold, K., Balshine, S., Brodin, T., Brooks, B. W., Maack, G., McCallum, E. S., Pyle, G., Saaristo, M., Ford, A. T. (2020). Emerging investigator series: Use of behavioural endpoints in the regulation of chemicals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(1), 49–65. <https://doi.org/10.1039/C9EM00463G>
4. Agrios, G. N. (2008). Control of Plant Diseases. U Plant pathology (5th ed., [3rd print], str. 293–353). Elsevier Academic Press.
5. Alkimin, G. D. D., Nunes, B., Soares, A. Mvm., Bellot, M., Gómez-Canela, C., Barata, C. (2020). *Daphnia magna* responses to fish kairomone and chlorpromazine exposures. *Chemico-Biological Interactions*, 325, 109123. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109123>
6. Allan, D. B., Caswell, T., Keim, N. C., van der Wel, C. M., Verweij, R. W. (2021). Trackpy (Verzija v0.5.0) [Python]. 10.5281/zenodo.4682814
7. Amossé, J., Bart, S., Brulle, F., Tebby, C., Beaudouin, R., Nélieu, S., Lamy, I., Péry, A. R. R., Pelosi, C. (2020). A two years field experiment to assess the impact of two fungicides on earthworm communities and their recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110979. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110979>
8. Arrázola-Vásquez, E., Larsbo, M., Capowicz, Y., Taylor, A., Sandin, M., Iseskog, D., Keller, T. (2022). Earthworm burrowing modes and rates depend on earthworm species and soil mechanical resistance. *Applied Soil Ecology*, 178, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104568>
9. Axelman, J., Aldrich, A., Duquesne, S., Backhaus, T., Brendel, S., Focks, A., Holz, S., Knillmann, S., Pieper, S., Silva, E., Schmied-Tobies, M., Topping, C. J., Wipfler, L., Williams, J., Sousa, J. P. (2024). A systems-based analysis to rethink the European environmental risk assessment of regulated chemicals using pesticides as a pilot case.

- Science of The Total Environment, 948, 174526.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174526>
10. Barata, C., Damasio, J., López, M. A., Kuster, M., De Alda, M. L., Barceló, D., Riva, M. C., Raldúa, D. (2007). Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(2), 370–379. <https://doi.org/10.1897/06-209R.1>
 11. Barata, C., Solayan, A., Porte, C. (2004). Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 66(2), 125–139.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.07.004>
 12. Bart, S., Jager, T., Robinson, A., Lahive, E., Spurgeon, D. J., Ashauer, R. (2021). Predicting Mixture Effects over Time with Toxicokinetic–Toxicodynamic Models (GUTS): Assumptions, Experimental Testing, and Predictive Power. *Environmental Science & Technology*, 55(4), 2430–2439. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05282>
 13. Bastardie, F., Capowiez, Y., Renault, P., Cluzeau, D. (2005). A radio-labelled study of earthworm behaviour in artificial soil cores in term of ecological types. *Biology and Fertility of Soils*, 41(5), 320–327. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0847-6>
 14. Beaumelle, L., Thouvenot, L., Hines, J., Jochum, M., Eisenhauer, N., Phillips, H. R. P. (2021). Soil fauna diversity and chemical stressors: A review of knowledge gaps and roadmap for future research. *Ecography*, 44(6), 845–859.
<https://doi.org/10.1111/ecog.05627>
 15. Beaumelle, L., Tison, L., Eisenhauer, N., Hines, J., Malladi, S., Pelosi, C., Thouvenot, L., Phillips, H. R. P. (2023). Pesticide effects on soil fauna communities—A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, 60(7), 1239–1253.
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.14437>
 16. Bianco, G., Ekvall, M. T., Bäckman, J., Hansson, L. (2013). Plankton 3D tracking: The importance of camera calibration in stereo computer vision systems. *Limnology and Oceanography: Methods*, 11(5), 278–286. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.278>
 17. Billoir, E., Péry, A. R. R., Charles, S. (2007). Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling*, 203(3–4), 204–214.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.11.021>
 18. Bláha, L., Hofman, J. (2020). Ecotoxicology of Environmental Pollutants. U J. Filip, T. Cajthaml, P. Najmanová, M. Černík, R. Zbořil (Ur.), *Advanced Nano-Bio Technologies*

- for Water and Soil Treatment (str. 549–572). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-29840-1_27
19. Bliss, C. I. (1939). THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY¹. *Annals of Applied Biology*, 26(3), 585–615. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x>
 20. Booth, L. H., O'Halloran, K. (2001). A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2494–2502.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620201115>
 21. Bouche, M. (1972). *Lombriciens de France. Ecologie et systematique*. INRA.
 22. Bouche, M. (1977). *Strategies lombriciennes. Soil Organisms as Components of Ecosystems* (eds. V. Lohm and T. Persson). 6th Int. Soil Zool. Coli., Stockholm.
 23. Bownik, A. (2017). *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, 601–602, 194–205.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>
 24. Bownik, A., Pawlik-Skowrońska, B. (2019). Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Science of The Total Environment*, 695, 133913.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133913>
 25. Bownik, A., Ślaska, B., Bochra, J., Gumieniak, K., Gałek, K. (2019). Procaine penicillin alters swimming behaviour and physiological parameters of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18662–18673.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05255-2>
 26. Bownik, A., Wlodkovic, D. (2021). Advances in real-time monitoring of water quality using automated analysis of animal behaviour. *Science of The Total Environment*, 789, 147796. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147796>
 27. Boyden, A. (1950). Is parthenogenesis sexual or asexual reproduction? *Nature*, 166(4228), 820. <https://doi.org/10.1038/166820a0>
 28. Bradski, G. (2000). The OpenCV Library. *Dr. Dobb's Journal of Software Tools*, 120, 122–125.
 29. Buskey, E. J., Peterson, J. O., Ambler, J. W. (1996). The swarming behavior of the copepod *Dioithona oculata*: In situ and laboratory studies. *Limnology and Oceanography*, 41(3), 513–521. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.3.0513>
 30. Cano, A. M., Maul, J. D., Saed, M., Shah, S. A., Green, M. J., Cañas-Carrell, J. E. (2017). Bioaccumulation, stress, and swimming impairment in *Daphnia magna* exposed

- to multiwalled carbon nanotubes, graphene, and graphene oxide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(8), 2199–2204. <https://doi.org/10.1002/etc.3754>
31. Capowiez, Y. (2000). Differences in burrowing behaviour and spatial interaction between the two earthworm species *Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora chlorotica*. *Biology and Fertility of Soils*, 30(4), 341–346. <https://doi.org/10.1007/s003740050013>
 32. Capowiez, Y., Bérard, A. (2006). Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.013>
 33. Capowiez, Y., Rault, M., Costagliola, G., Mazzia, C. (2005). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*). *Biology and Fertility of Soils*, 41(3), 135–143. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0829-0>
 34. Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., Belzunces, L. (2003). Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia*, 47(5–6), 542–547. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00226>
 35. Capowiez, Y., Sammartino, S., Michel, E. (2011). Using X-ray tomography to quantify earthworm bioturbation non-destructively in repacked soil cores. *Geoderma*, 162(1–2), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.01.011>
 36. Caro, G., Abourachid, A., Decaëns, T., Buono, L., Mathieu, J. (2012). Is earthworms' dispersal facilitated by the ecosystem engineering activities of conspecifics? *Biology and Fertility of Soils*, 48(8), 961–965. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0694-1>
 37. Casida, J. E., Durkin, K. A. (2013). Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
 38. Cedergreen, N., Christensen, A. M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Streibig, J. C., Sørensen, H. (2008). A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1621–1632. <https://doi.org/10.1897/07-474.1>
 39. Cedergreen, N., Dalhoff, K., Li, D., Gottardi, M., Kretschmann, A. C. (2017). Can Toxicokinetic and Toxicodynamic Modeling Be Used to Understand and Predict

- Synergistic Interactions between Chemicals? *Environmental Science & Technology*, 51(24), 14379–14389. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02723>
40. Cedergreen, N., Kamper, A., Streibig, J. C. (2006). Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquatic Toxicology*, 78(3), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.007>
 41. Chalvet-Monfray, K., Sabatier, P., Belzunces, L. P., Colin, M. E., Fléché, C. (1996). Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(4), 525–534. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150418>
 42. Chen, L., Fu, X., Zhang, G., Zeng, Y., Ren, Z. (2012). Influences of Temperature, pH and Turbidity on the Behavioral Responses of *Daphnia magna* and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) in the Biomonitor. *Procedia Environmental Sciences*, 13, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.007>
 43. Chevalier, J., Grote, M., Keller, M., Pandard, P., Cachot, J. (2014). A New Multi-cell Exposure System for Continuous Tracking of *Daphnia* Behavior for Toxicity Assessments. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000246>
 44. Cho, Y., Jonas-Closs, R. A., Yampolsky, L. Y., Kirschner, M. W., Peshkin, L. (2022). Intelligent high-throughput intervention testing platform in *Daphnia*. *Aging Cell*, 21(3), e13571. <https://doi.org/10.1111/accel.13571>
 45. Cuhra, M., Traavik, T., Bøhn, T. (2013). Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(2), 251–262. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1021-1>
 46. Cushing, J. M., Henson, S. M., Hayward, J. L. (2015). An evolutionary game-theoretic model of cannibalism. *Natural Resource Modeling*, 28(4), 497–521. <https://doi.org/10.1111/nrm.12079>
 47. Dang, Z., Cheng, Y., Chen, H., Cui, Y., Yin, H., Traas, T., Montforts, M., Vermeire, T. (2012). Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors. *Chemosphere*, 88(4), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.012>
 48. Darvesh, S., Darvesh, K. V., McDonald, R. S., Mataija, D., Walsh, R., Mothana, S., Lockridge, O., Martin, E. (2008). Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(14), 4200–4212. <https://doi.org/10.1021/jm8002075>

49. De Silva, P. M. C. S., Pathiratne, A., Van Gestel, C. A. M. (2010). Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*. *Applied Soil Ecology*, 44(1), 56–60.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.09.005>
50. Dell’Omo, G. (Ur.). (2002). *Behavioural ecotoxicology*. Wiley.
51. Dittbrenner, N., Triebkorn, R., Moser, I., Capowicz, Y. (2010). Physiological and behavioural effects of imidacloprid on two ecologically relevant earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*). *Ecotoxicology*, 19(8), 1567–1573.
<https://doi.org/10.1007/s10646-010-0542-8>
52. Djerdj, T., Hackenberger, D. K., Hackenberger, D. K., Hackenberger, B. K. (2020). Observing earthworm behavior using deep learning. *Geoderma*, 358, 113977.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.113977>
53. Dodson, S. I., Hanazato, T., Gorski, P. R. (1995). Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus kairiromone*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(1), 43–50. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140106>
54. Døving, K. B. (1991). Assessment of animal behaviour as a method to indicate environmental toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1–2), 247–252. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90162-M](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90162-M)
55. Duquesne, S., Küster, E. (2010). Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.11.008>
56. Ebert, D. (2005). Chapter 2, Introduction to *Daphnia* Biology. U Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* (str. 5–26). National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>
57. Ebert, D. (2022). *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>
58. Ebner, J. N. (2021). Trends in the Application of “Omics” to Ecotoxicology and Stress Ecology. *Genes*, 12(10), 1481. <https://doi.org/10.3390/genes12101481>
59. Edwards, C. A. (Ur.). (2004). *Earthworm Ecology* (2nd ed). International Symposium on Earthworm Ecology, Boca Raton, Fla. CRC Press.
60. Edwards, C. A., Arancon, N. Q. (2022). *Biology and Ecology of Earthworms*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74943-3>
61. EFSA Scientific Committee, More, S. J., Bampidis, V., Benford, D., Bennekou, S. H., Bragard, C., Halldorsson, T. I., Hernández-Jerez, A. F., Koutsoumanis, K., Naegeli, H.,

- Schlatter, J. R., Silano, V., Nielsen, S. S., Schrenk, D., Turck, D., Younes, M., Benfenati, E., Castle, L., Cedergreen, N., ... Hogstrand, C. (2019). Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal*, 17(3).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5634>
62. Egan, N., Stinson, S. A., Deng, X., Lawler, S. P., Connon, R. E. (2023). Swimming Behavior of *Daphnia magna* Is Altered by Pesticides of Concern, as Components of Agricultural Surface Water and in Acute Exposures. *Biology*, 12(3), 425.
<https://doi.org/10.3390/biology12030425>
63. Erickson, R. A., Cox, S. B., Oates, J. L., Anderson, T. A., Salice, C. J., Long, K. R. (2014). A *Daphnia* population model that considers pesticide exposure and demographic stochasticity. *Ecological Modelling*, 275, 37–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.12.015>
64. Espinoza-Navarro, O., Bustos-Obregón, E. (2005). Effect of malathion on the male reproductive organs of earthworms, *Eisenia foetida*. *Asian Journal of Andrology*, 7(1), 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00005.x>
65. European Commission. (2002, listopad 17). Guidance Document of Aquatic Ecotoxicology in the Context of the Directive 91/414/EEC (Sanco/3268/2001 rev.4 (final)). Health Consumer Protection Directorate-General.
<https://www.pan-europe.info/sites/pan-europe.info/files/public/resources/other/Guidance%20Document%20on%20Aquatic%20Ecotoxicology.pdf>
66. Evans, A. C. (1947). LVII.—A method of studying the burrowing activities of earthworms. *Annals and Magazine of Natural History*, 14(117), 643–650.
<https://doi.org/10.1080/00222934708654673>
67. Falgueras-Cano, J., Falgueras-Cano, J.-A., Moya, A. (2024). The influence of stochastic fluctuations on population dynamics: An in-silico approach. *Ecological Modelling*, 490, 110668. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2024.110668>
68. FAO. (2020). FAO Specifications And Evaluations For Agricultural Pesticides. Chlorpyrifos. O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate. Food and Agriculture Organization of the United Nations. fao.org/3/ca8091en/ca8091en.pdf
69. FAO, UNEP. (2021). Global assessment of soil pollution: Report. FAO and UNEP.
<https://doi.org/10.4060/cb4894en>

70. Felten, D., Emmerling, C. (2009). Earthworm burrowing behaviour in 2D terraria with single- and multi-species assemblages. *Biology and Fertility of Soils*, 45(8), 789–797. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0393-8>
71. Ferguson, S., Mesnage, R., Antoniou, M. N. (2022). Cytotoxicity Mechanisms of Eight Major Herbicide Active Ingredients in Comparison to Their Commercial Formulations. *Toxics*, 10(11), 711. <https://doi.org/10.3390/toxics10110711>
72. Filho, A. D. S. F., Da Costa, S. M., Ribeiro, M. G. L., Azevedo, S. M. F. O. (2008). Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environmental Toxicology*, 23(2), 161–168. <https://doi.org/10.1002/tox.20320>
73. Fisher, A. M., Cornell, S. J., Holwell, G. I., Price, T. A. R. (2018). Sexual cannibalism and population viability. *Ecology and Evolution*, 8(13), 6663–6670. <https://doi.org/10.1002/ece3.4155>
74. Fisher, D. N., James, A., Rodríguez-Muñoz, R., Tregenza, T. (2015). Behaviour in captivity predicts some aspects of natural behaviour, but not others, in a wild cricket population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1809), 20150708. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0708>
75. Fleeger, J. W., Carman, K. R., Nisbet, R. M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 317(1–3), 207–233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4)
76. Ford, A. T., Ågerstrand, M., Brooks, B. W., Allen, J., Bertram, M. G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J. M., Ledesma, M., Melvin, S. D., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G. G., ... Maack, G. (2021). The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environmental Science & Technology*, 55(9), 5620–5628. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493>
77. Fox, L. R. (1975). Cannibalism in Natural Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 6, 87–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.06.110175.000511>
78. Frid, A., Dill, L. M. (2002). Human-caused Disturbance Stimuli as a Form of Predation Risk. *Conservation Ecology*, 6(1), art11. <https://doi.org/10.5751/ES-00404-060111>
79. Fründ, H.-C., Graefe, U., Tischer, S. (2011). Earthworms as Bioindicators of Soil Quality. U A. Karaca (Ur.), *Biology of Earthworms* (Sv. 24, str. 261–278). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14636-7_16

80. Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 245–254.
<https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>
81. Gao, M., Song, W., Zhang, J., Guo, J. (2013). Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.003>
82. 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(2), 450–456.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.007>
83. García-Santos, G., Keller-Forrer, K. (2011). Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*, 84(5), 651–656.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.036>
84. Gerhardt, A. (2007). Aquatic Behavioral Ecotoxicology—Prospects and Limitations. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13(3), 481–491.
<https://doi.org/10.1080/10807030701340839>
85. Gobas, F. A., Burkhard, L. P., Doucette, W. J., Sappington, K. G., Verbruggen, E. M., Hope, B. K., Bonnell, M. A., Arnot, J. A., Tarazona, J. V. (2016). Review of existing terrestrial bioaccumulation models and terrestrial bioaccumulation modeling needs for organic chemicals. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 12(1), 123–134. <https://doi.org/10.1002/ieam.1690>
86. Gomes, S., Scott-Fordsmand, J., Amorim, M. (2015). Cellular Energy Allocation to Assess the Impact of Nanomaterials on Soil Invertebrates (Enchytraeids): The Effect of Cu and Ag. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(6), 6858–6878. <https://doi.org/10.3390/ijerph120606858>
87. Gordon, D. M. (1991). Variation and Change in Behavioral Ecology. *Ecology*, 72(4), 1196–1203. <https://doi.org/10.2307/1941093>
88. Griffith, B., Türke, M., Weisser, W. W., Eisenhauer, N. (2013). Herbivore behavior in the anecic earthworm species *Lumbricus terrestris* L.? *European Journal of Soil Biology*, 55, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.12.002>
89. Gupta, S. K., Sundararaman, V. (1991). Correlation between Burrowing Capability and AChE Activity in the Earthworm, *Pheretima posthuma*, on Exposure to Carbaryl.

- Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 46, 859–865.
<https://doi.org/10.1007/BF01689730>
90. Hackenberger Kutuzović, D., Hackenberger Kutuzović, B., Hackenberger Kutuzović, D. (2015). Ključ za određivanje gujavica Hrvatske (ErIK). BioQuant d.o.o., Osijek.
 91. Häder, D.-P., Erzinger, G. S. (2017). Daphniatox – Online monitoring of aquatic pollution and toxic substances. Chemosphere, 167, 228–235.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.155>
 92. Harris, C. R., Millman, K. J., Van Der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor, J., Berg, S., Smith, N. J., Kern, R., Picus, M., Hoyer, S., Van Kerkwijk, M. H., Brett, M., Haldane, A., Del Río, J. F., Wiebe, M., Peterson, P., ... Oliphant, T. E. (2020). Array programming with NumPy. Nature, 585(7825), 357–362. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>
 93. He, L., Xiao, K., Zhou, C., Li, G., Yang, H., Li, Z., Cheng, J. (2019). Insights into pesticide toxicity against aquatic organism: QSTR models on *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 173, 285–292.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.014>
 94. Hellou, J. (2011). Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. Environmental Science and Pollution Research, 18(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>
 95. Heugens, E. H. W., Hendriks, A. J., Dekker, T., Straalen, N. M. V., Admiraal, W. (2001). A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. Critical Reviews in Toxicology, 31(3), 247–284. <https://doi.org/10.1080/20014091111695>
 96. Heuschele, J., Lode, T., Andersen, T., Borgå, K., Titelman, J. (2019). An affordable and automated imaging approach to acquire highly resolved individual data—An example of copepod growth in response to multiple stressors. PeerJ, 7, e6776.
<https://doi.org/10.7717/peerj.6776>
 97. Holmstrup, M. (2001). Sensitivity of life history parameters in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to small changes in soil water potential. Soil Biology and Biochemistry, 33(9), 1217–1223. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00026-8)
 98. Hund-Rinke, K., Wiechering, H. (2001). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. Journal of Soils and Sediments, 1(1), 15–20. <https://doi.org/10.1007/BF02986464>

99. Hussain, A., Audira, G., Malhotra, N., Uapipatanakul, B., Chen, J.-R., Lai, Y.-H., Huang, J.-C., Chen, K. H.-C., Lai, H.-T., Hsiao, C.-D. (2020). Multiple Screening of Pesticides Toxicity in Zebrafish and *Daphnia* Based on Locomotor Activity Alterations. *Biomolecules*, 10(9), 1224. <https://doi.org/10.3390/biom10091224>
100. ISO. (2008). ISO 17512-1:2008 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*) (Nos. 17512-1:2008). <https://www.iso.org/standard/38402.html>
101. ISO. (2012). ISO 6341:2012 Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Acute toxicity test (No. BS EN ISO 6341:2012). [https://doi.org/ISBN 978 0 580 69874 3](https://doi.org/ISBN%20978%20580%2069874%203)
102. ISO. (2023). ISO 11268-2:2023-11, Bodenbeschaffenheit_ - Wirkungen von Verunreinigungen auf Regenwürmer_ - Teil_2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida/Eisenia andrei* und andere Regenwurmarten (ISO_11268-2:2023); Deutsche Fassung EN_ISO_11268-2:2023. DIN Media GmbH. <https://doi.org/10.31030/3416896>
103. Jager, T., Vandenbrouck, T., Baas, J., De Coen, W. M., Kooijman, S. A. L. M. (2010). A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology*, 19(2), 351–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0417-z>
104. Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Sepčić, K. (2010). Biochemical biomarkers in environmental studies—Lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 571–581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>
105. Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Trebše, P., Roš, M., Sepčić, K. (2007). The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(4), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.10.002>
106. Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., Trebše, P. (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 68(8), 1408–1418. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.015>
107. Jennions, M. D., Petrie, M. (1997). Variation in mate choice and mating preferences: A review of causes and consequences. *Biological Reviews*, 72(2), 283–327. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1997.tb00015.x>

108. Jeon, J., Kretschmann, A., Escher, B. I., Hollender, J. (2013). Characterization of acetylcholinesterase inhibition and energy allocation in *Daphnia magna* exposed to carbaryl. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 28–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.033>
109. Jeong, T. Y., Jeon, J., Kim, S. D. (2014). Development and evaluation of new behavioral indexes for a biological early warning system using *Daphnia magna*. *Drinking Water Engineering and Science*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.5194/dwes-7-1-2014>
110. Johnson, A. R., Rodgers, J. H. (2005). Scaling in ecotoxicology: Theory, evidence and research needs. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 8(4), 353–362.
<https://doi.org/10.1080/14634980500457765>
111. Jones, C. G., Lawton, J. H., Shachak, M. (1994). Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*, 69(3), 373. <https://doi.org/10.2307/3545850>
112. Joschko, M., Müller, P. C., Kotzke, K., Döhring, W., Larink, O. (1993). Earthworm burrow system development assessed by means of X-ray computed tomography. U *Soil Structure/Soil Biota Interrelationships* (str. 209–221). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81490-6.50021-2>
113. Kalyabina, V. P., Esimbekova, E. N., Kopylova, K. V., Kratasyuk, V. A. (2021). Pesticides: Formulants, distribution pathways and effects on human health – a review. *Toxicology Reports*, 8, 1179–1192. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.004>
114. Keith, A. M., Robinson, D. A. (2012). Earthworms as Natural Capital: Ecosystem Service Providers in Agricultural Soils.
115. Kim, J., Yuk, H., Choi, B., Yang, M., Choi, S., Lee, K.-J., Lee, S., Heo, T.-Y. (2023). New machine learning-based automatic high-throughput video tracking system for assessing water toxicity using *Daphnia magna* locomotory responses. *Scientific Reports*, 13(1), 3530. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27554-y>
116. Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M., Takács, E., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., Székács, A. (2024). Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: Evidence from 2010 to 2023. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 22.
<https://doi.org/10.1186/s12302-024-00849-1>
117. Kodama, N., Kimura, T., Yonemura, S., Kaneda, S., Ohashi, M., Ikeno, H. (2014). Automated Analysis of Two-Dimensional Positions and Body Lengths of Earthworms (Oligochaeta); MimizuTrack. *PLoS ONE*, 9(6), e97986.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097986>

118. Kunze, J., Hartmann, S., Witte, K., Kuhnert, K.-D. (2016). *Daphnia magna* as biosensor for Ag-nanoparticles in water systems: Development of a computer vision system for the detection of behavioral changes. 23rd International Conference on Pattern Recognition (ICPR). [http://homepages. inf. ed. ac. uk/rbf/VAIB16PAPERS/vaibkunze.pdf](http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/VAIB16PAPERS/vaibkunze.pdf)
119. Langer, S. M., Horstmann, M., Weiss, L. C., Junke, W., Herlitze, S., Tollrian, R. (2021). On *Daphnia* 's path: A semi-automatic system to analyze three-dimensional movement patterns. *Ecosphere*, 12(12), e03847. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3847>
120. Lavelle, P., Spain, A. V. (2001). *Soil Ecology*. Springer.
121. Lemm, J. U., Venohr, M., Globevnik, L., Stefanidis, K., Panagopoulos, Y., Van Gils, J., Posthuma, L., Kristensen, P., Feld, C. K., Mahnkopf, J., Hering, D., Birk, S. (2021). Multiple stressors determine river ecological status at the European scale: Towards an integrated understanding of river status deterioration. *Global Change Biology*, 27(9), 1962–1975. <https://doi.org/10.1111/gcb.15504>
122. Li, H., Zhang, Q., Su, H., You, J., Wang, W.-X. (2021). High Tolerance and Delayed Responses of *Daphnia magna* to Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid: Toxicokinetic and Toxicodynamic Modeling. *Environmental Science & Technology*, 55(1), 458–467. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05664>
123. Liess, M., Schulz, R. (1999). Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(9), 1948–1955. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180913>
124. Little, E. E. (1990). Behavioral toxicology: Stimulating challenges for a growing discipline. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1), 1–2. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090101>
125. Liu, Y. D., Wu, F. C., Ji, C. W., Chon, T. S. (2012). Movement Patterning of *Daphnia magna* Treated with Copper Based on Self-Organizing Map. *Procedia Environmental Sciences*, 13, 994–1002. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.092>
126. Liu, M., Deng, P., Li, G., Liu, H., Zuo, J., Cui, W., Zhang, H., Chen, X., Yao, J., Peng, X., Peng, L., Liu, J., Zheng, W., Yan, W., Luan, N. (2024). Neurotoxicity of Combined Exposure to the Heavy Metals (Pb and As) in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxics*, 12(4), 282. <https://doi.org/10.3390/toxics12040282>
127. Long, J., Shelhamer, E., Darrell, T. (2015). Fully Convolutional Networks for Semantic Segmentation (No. arXiv:1411.4038). arXiv. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1411.4038>
128. Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A. L. G., Pinheiro, C., Ribeiro, F., Soares, A. M. V. M. (2010). Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical

- modes of action and deviations from conceptual models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1716–1726. <https://doi.org/10.1002/etc.198>
129. Lovern, S. B., Strickler, J. R., Klaper, R. (2007). Behavioral and Physiological Changes in *Daphnia magna* when Exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C60, and C60 HxC70 Hx). *Environmental Science & Technology*, 41(12), 4465–4470. <https://doi.org/10.1021/es062146p>
130. Man, Y., Sun, T., Wu, C., Liu, X., He, M. (2023). Evaluating the Impact of Individual and Combined Toxicity of Imidacloprid, Cyclozaprid, and Tebuconazole on *Daphnia magna*. *Toxics*, 11(5), 428. <https://doi.org/10.3390/toxics11050428>
131. Martin-Betancor, K., Ritz, C., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Rodea-Palomares, I. (2015). Defining an additivity framework for mixture research in inducible whole-cell biosensors. *Scientific Reports*, 5(1), 17200. <https://doi.org/10.1038/srep17200>
132. Mather, J. G., Christensen, O. (1988). Surface movements of earthworms in agricultural land. *Pedobiologia*, 32(5–6), 399–406. [https://doi.org/10.1016/S0031-4056\(23\)00258-5](https://doi.org/10.1016/S0031-4056(23)00258-5)
133. Matsumoto, K.-I., Hosokawa, M., Kuroda, K., Endo, G. (2009). Toxicity of Agricultural Chemicals in *Daphnia magna*. *Osaka City Medical Journal*, 55(2), 89–97. <https://doi.org/PMID:20088408>
134. Matyja, K. (2023). Sublethal effects of binary mixtures of Cu and Cd on *Daphnia magna*: Standard Dynamic Energy Budget (DEB) model analysis ☆. *Environmental Pollution*, 334. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122142>
135. Meadows, S. L., Gennings, C., Carter, W. H., Bae, D.-S. (2002). Experimental designs for mixtures of chemicals along fixed ratio rays. *Environmental Health Perspectives*, 110(suppl 6), 979–983. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s6979>
136. Melvin, S. D., Petit, M. A., Duvignacq, M. C., Sumpter, J. P. (2017). Towards improved behavioural testing in aquatic toxicology: Acclimation and observation times are important factors when designing behavioural tests with fish. *Chemosphere*, 180, 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.058>
137. Melvin, S. D., Wilson, S. P. (2013). The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis. *Chemosphere*, 93(10), 2217–2223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.036>
138. Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux De Vendômois, J., Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>

139. Miglani, R., Bisht, S. S. (2019). World of earthworms with pesticides and insecticides. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(2), 71–82. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0008>
140. Mokry, L. E., Hoagland, K. D. (1990). Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(8), 1045–1051. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090811>
141. Moreira, R. A., Polo-Castellano, C., Cordero-de-Castro, A., Dias, M. A., Pinto, T. J. S., Montagner, C. C., Espíndola, E. L. G., Blasco, J., Araújo, C. V. M. (2023). Short and long-term exposure to the pesticides fipronil and 2,4-D: Effects on behavior and life history of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 310, 136719. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136719>
142. Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
143. Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T. J., Godderis, L., Ádám, B. (2020). Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environmental Research*, 181, 108926. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
144. Nilsen, E., Smalling, K. L., Ahrens, L., Gros, M., Miglioranza, K. S. B., Picó, Y., Schoenfuss, H. L. (2019). Critical review: Grand challenges in assessing the adverse effects of contaminants of emerging concern on aquatic food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(1), 46–60. <https://doi.org/10.1002/etc.4290>
145. Noss, C., Dabrunz, A., Rosenfeldt, R. R., Lorke, A., Schulz, R. (2013). Three-Dimensional Analysis of the Swimming Behavior of *Daphnia magna* Exposed to Nanosized Titanium Dioxide. *PLoS ONE*, 8(11), e80960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080960>
146. Noss, C., Lorke, A., Niehaus, E. (2013). Three-dimensional tracking of multiple aquatic organisms with a two camera system. *Limnology and Oceanography: Methods*, 11(3), 139–150. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.139>
147. Nuutinen, V., Butt, K. R. (1997). The mating behaviour of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Journal of Zoology*, 242(4), 783–798. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1997.tb05826.x>
148. Nuutinen, V., Butt, K. R., Jauhiainen, L., Shipitalo, M. J., Sirén, T. (2014). Dew-worms in white nights: High-latitude light constrains earthworm (*Lumbricus terrestris*)

- behaviour at the soil surface. *Soil Biology and Biochemistry*, 72, 66–74.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.023>
149. OECD. (1984). Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD.
<https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>
150. OECD. (2004). Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. OECD.
<https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
151. OECD. (2012). Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD.
<https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
152. OECD. (2018). Considerations for Assessing the Risks of Combined Exposure to Multiple Chemicals. OECD Environment, Health and Safety Division, Environment Directorate. <https://doi.org/10.1787/ceca15a9-en>
153. Palmér, T. (2017). Computer vision based analysis of animal behavior. Mathematics, Centre for Mathematical Sciences, Faculty of Engineering, Lund University.
154. Pawar, S., Shahezad, A. (2013). Impact of Organophosphate (Chloropyriphose) on Weight and Growth of Earthworm, *Eisenia foetida*. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(2), 1660–1663. <https://doi.org/Paper ID: SUB151568>
155. Peakall, D. B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, 3(3), 157–160. <https://doi.org/10.1007/BF00117080>
156. Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandenbulcke, F. (2014). Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 199–228.
<https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>
157. Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Néliu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., Fritsch, C. (2021). Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems Environment*, 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
158. Pérez, G. L., Solange Vera, M., Miranda, L. (2011). Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. U Herbicides and Environment. InTech. <https://doi.org/10.5772/12877>
159. Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R. C., Arganda, S., De Polavieja, G. G. (2014). idTracker: Tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nature Methods*, 11(7), 743–748.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2994>

160. Perreault, J. M., Whalen, J. K. (2006). Earthworm burrowing in laboratory microcosms as influenced by soil temperature and moisture. *Pedobiologia*, 50(5), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.07.003>
161. Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K. Cl., Moreira-Santos, M., Vollat, B., Törökne, A., Han, T. (2009). Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 393, 01. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009012>
162. Peterson, E. K., Buchwalter, D. B., Kerby, J. L., LeFauve, M. K., Varian-Ramos, C. W., Swaddle, J. P. (2017). Integrative behavioral ecotoxicology: Bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Current Zoology*, 63(2), 185–194. <https://doi.org/10.1093/cz/zox010>
163. Porrás-Rivera, G., Górski, K., Colin, N. (2024). Behavioral biomarkers in fishes: A non-lethal approach to assess the effects of chemical pollution on freshwater ecosystems. *Environmental Research*, 260, 119607. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119607>
164. Posthuma, L., De Zwart, D., Dyer, S. D. (2019). Chemical mixtures affect freshwater species assemblages: From problems to solutions. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 11, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.09.002>
165. Prat, O., Degli-Esposti, D. (2019). New Challenges: Omics Technologies in Ecotoxicology. *U Ecotoxicology* (str. 181–208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-314-1.50006-7>
166. Price, C. L., Parker, J. E., Warrilow, A. G., Kelly, D. E., Kelly, S. L. (2015). Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens: Mode of action and resistance mechanisms to azole fungicides. *Pest Management Science*, 71(8), 1054–1058. <https://doi.org/10.1002/ps.4029>
167. Printes, L. B., Callaghan, A. (2004). A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1241–1247. <https://doi.org/10.1897/03-202>
168. Qin, F., Zhao, N., Yin, G., Wang, T., Jv, X., Han, S., An, L. (2024). Rapid Response of *Daphnia magna* Motor Behavior to Mercury Chloride Toxicity Based on Target Tracking. *Toxics*, 12(9), 621. <https://doi.org/10.3390/toxics12090621>

169. Qiu, X., Tanoue, W., Kawaguchi, A., Yanagawa, T., Seki, M., Shimasaki, Y., Honjo, T., Oshima, Y. (2017). Interaction patterns and toxicities of binary and ternary pesticide mixtures to *Daphnia magna* estimated by an accelerated failure time model. *Science of The Total Environment*, 607–608, 367–374.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.034>
170. R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing (Verzija 4.4.1) [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
171. Rajashree, M., Reddy, P. (2014). Effect of Organophosphate Pesticide “Methyl Parathion” and “Phorate” on Earthworm Central Nervous System. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*, 10(3), 483–485.
https://statperson.com/Journal/ScienceAndTechnology/Article/Volume10Issue3/10_3_21.pdf
172. Rastetter, N., Gerhardt, A. (2018). Continuous monitoring of avoidance behaviour with the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Soils and Sediments*, 18(3), 957–967.
<https://doi.org/10.1007/s11368-017-1791-4>
173. Reilly, K., Ellis, L.-J. A., Davoudi, H. H., Supian, S., Maia, M. T., Silva, G. H., Guo, Z., Martinez, D. S. T., Lynch, I. (2023). *Daphnia* as a model organism to probe biological responses to nanomaterials—From individual to population effects via adverse outcome pathways. *Frontiers in Toxicology*, 5, 1178482.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1178482>
174. Ren, Q., Zhao, R., Wang, C., Li, S., Zhang, T., Ren, Z., Yang, M., Pan, H., Xu, S., Zhu, J., Wang, X. (2017). The Role of AChE in Swimming Behavior of *Daphnia magna*: Correlation Analysis of Both Parameters Affected by Deltamethrin and Methomyl Exposure. *Journal of Toxicology*, 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/3265727>
175. Ren, Z., Li, Z., Ma, M., Wang, Z., Fu, R. (2009). Behavioral Responses of *Daphnia magna* to Stresses of Chemicals with Different Toxic Characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(3), 310–316.
<https://doi.org/10.1007/s00128-008-9588-1>
176. Ren, Z., Zha, J., Ma, M., Wang, Z., Gerhardt, A. (2007). The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 134(1–3), 373–383.
<https://doi.org/10.1007/s10661-007-9629-y>
177. Ren, Z., Zhang, X., Wang, X., Qi, P., Zhang, B., Zeng, Y., Fu, R., Miao, M. (2015). AChE inhibition: One dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia*

- magna* under DDVP exposure. *Chemosphere*, 120, 252–257.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.081>
178. Rhind, S. M. (2009). Anthropogenic pollutants: A threat to ecosystem sustainability? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3391–3401. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0122>
179. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
180. Rodney, S. I., Teed, R. S., Moore, D. R. J. (2013). Estimating the Toxicity of Pesticide Mixtures to Aquatic Organisms: A Review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 19(6), 1557–1575. <https://doi.org/10.1080/10807039.2012.723180>
181. Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P. L., Andersson, M. (2018). ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(3), 460–464. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12874>
182. Roeben, V., Oberdoerster, S., Rakel, K. J., Liesy, D., Capowiez, Y., Ernst, G., Preuss, T. G., Gergs, A., Oberdoerster, C. (2020). Towards a spatiotemporally explicit toxicokinetic-toxicodynamic model for earthworm toxicity. *Science of The Total Environment*, 722, 137673. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137673>
183. Ronneberger, O., Fischer, P., Brox, T. (2015). U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. U N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells, A. F. Frangi (Ur.), *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015* (Sv. 9351, str. 234–241). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28
184. Roy, F., Barbier, M., Biroli, G., Bunin, G. (2020). Complex interactions can create persistent fluctuations in high-diversity ecosystems. *PLOS Computational Biology*, 16(5), e1007827. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007827>
185. Ruomeng, B., Meihao, O., Siru, Z., Shichen, G., Yixian, Z., Junhong, C., Ruijie, M., Yuan, L., Gezhi, X., Xingyu, C., Shiyi, Z., Aihui, Z., Baishan, F. (2023). Degradation strategies of pesticide residue: From chemicals to synthetic biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(2), 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2023.03.005>
186. Saad Saoud, L., Sultan, A., Elmezain, M., Heshmat, M., Seneviratne, L., Hussain, I. (2024). Beyond observation: Deep learning for animal behavior and ecological conservation. *Ecological Informatics*, 84, 102893.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2024.102893>

187. Sancho, E., Villarroel, M. J., Andreu, E., Ferrando, M. D. (2009). Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere*, 74(9), 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.076>
188. Sancho, E., Villarroel, M. J., Ferrando, M. D. (2016). Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.034>
189. Sandhu, P., Shura, O., Murray, R. L., Guy, C. (2018). Worms make risky choices too: The effect of starvation on foraging in the common earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Canadian Journal of Zoology*, 96(11), 1278–1283. <https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0006>
190. Schell, T., Goedkoop, W., Zubrod, J. P., Feckler, A., Lüderwald, S., Schulz, R., Bundschuh, M. (2018). Assessing the effects of field-relevant pesticide mixtures for their compliance with the concentration addition model – An experimental approach with *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 644, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.334>
191. Schuijt, L. M., Peng, F.-J., Van Den Berg, S. J. P., Dingemans, M. M. L., Van Den Brink, P. J. (2021). (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of The Total Environment*, 795, 148776. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>
192. Schultz, T. W., Kennedy, J. R. (1976). CYTOTOXIC EFFECTS OF THE HERBICIDE 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE ON *DAPHNIA PULEX* (CRUSTACEA:CLADOCERA). *The Biological Bulletin*, 151(2), 370–385. <https://doi.org/10.2307/1540669>
193. Scott, G. R., Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
194. Selye, H. (1973). The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American Scientist*, 61(6), 692–699. <http://www.jstor.org/stable/27844072>
195. Siregar, P., Hsieh, Y., Audira, G., Suryanto, M. E., Macabeo, A. P., Vasquez, R. D., Hsiao, C. (2024). Toxicity evaluation of neonicotinoids to earthworm (*Eisenia fetida*) behaviors by a novel locomotion tracking assay. *Environmental Pollution*, 351, 124111. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124111>

196. Söchtig, W., Larink, O. (1992). Effect of soil compaction on activity and biomass of endogeic lumbricids in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(12), 1595–1599. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90156-R](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90156-R)
197. Solomon, K. R., Brock, T. C. M., Zwart, D. D., Dyer, S. D., Posthuma, L., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K. (2008). *Extrapolation Practice for Ecotoxicological Effect Characterization of Chemicals* (1. izd.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b13610>
198. Spurgeon, D. J., Svendsen, C., Rimmer, V. R., Hopkin, S. P., Weeks, J. M. (2000). RELATIVE SENSITIVITY OF LIFE-CYCLE AND BIOMARKER RESPONSES IN FOUR EARTHWORM SPECIES EXPOSED TO ZINC. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1800–1808. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190714>
199. Stehle, S., Schulz, R. (2015). Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5750–5755. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500232112>
200. Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., Forbes, V. E. (2008). Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.010>
201. Tallarida, R. J. (2016). Drug Combinations: Tests and Analysis with Isoboles. *Current Protocols in Pharmacology*, 72(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0919s72>
202. Tarikoğulları, A. H., Çizmecioğlu, M., Saylam, M., Parlar, S., Alptüzün, V., Soyer, Z. (2015). Synthesis and cholinesterase inhibitory activity of some phenylacetamide derivatives bearing 1H-pyrazole and 1H-1,2,4-triazole. *MARMARA PHARMACEUTICAL JOURNAL*, 20(1), 21. <https://doi.org/10.12991/mpj.2016202105828>
203. Tennekes, H. A. (2019). Imidacloprid and the Druckrey-Küpfmüller Equation—The Fundamental Importance of the Nature of Receptor Binding and Associated Adverse Effects. *Open Access Journal of Toxicology*, 3(5). <https://doi.org/10.19080/OAJT.2018.03.555623>
204. Tison, L., Beaumelle, L., Monceau, K., Thiéry, D. (2024). Transfer and bioaccumulation of pesticides in terrestrial arthropods and food webs: State of knowledge and perspectives for research. *Chemosphere*, 357, 142036. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142036>

205. Tiwari, R. K., Singh, S., Pandey, R. S., Sharma, B. (2016). Enzymes of Earthworm as Indicators of Pesticide Pollution in Soil. *Advances in Enzyme Research*, 04(04), 113–124. <https://doi.org/10.4236/aer.2016.44011>
206. Truhaut, R. (1977). *Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2), 151–173. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(77\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1)
207. Tu, M., Randall, J. M. (2001). Chapter 8—ADJUVANTS. *U Weed Control Methods Handbook: Tools Techniques for Use in Natural Areas* (str. 171–195). The Nature Conservancy. <https://www.invasive.org/gist/products/handbook/methods-handbook.pdf>
208. Untersteiner, H., Kahapka, J., Kaiser, H. (2003). Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal Copper stress—Validation by image analysis. *Aquatic Toxicology*, 65(4), 435–442. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00157-7)
209. Ushio, M., Hsieh, C., Masuda, R., Deyle, E. R., Ye, H., Chang, C.-W., Sugihara, G., Kondoh, M. (2018). Fluctuating interaction network and time-varying stability of a natural fish community. *Nature*, 554(7692), 360–363. <https://doi.org/10.1038/nature25504>
210. Valckx, J., Pennings, A., Leroy, T., Berckmans, D., Govers, G., Hermy, M., Muys, B. (2010). Automated observation and analysis of earthworm surface behaviour under experimental habitat quality and availability conditions. *Pedobiologia*, 53(4), 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2009.12.005>
211. Vasseur, P., Masfaraud, J.-F., Blaise, C. (2021). *Ecotoxicology, revisiting its pioneers*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(4), 3852–3857. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11236-7>
212. Vera-Herrera, L., Araújo, C. V. M., Cordero-De-Castro, A., Blasco, J., Picó, Y. (2022). Assessing the colonization by *Daphnia magna* of pesticide-disturbed habitats (chlorpyrifos, terbuthylazine and their mixtures) and the behavioral and neurotoxic effects. *Environmental Pollution*, 311, 119983. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119983>
213. Verbruggen, E. M. J., van den Brink, P. J. (2010). Review of recent literature concerning mixture toxicity of pesticides to aquatic organisms (No. 601400001/2010; str. 36). National Institute for Public Health and the Environment. <https://edepot.wur.nl/155269>
214. Walker, C. H., Silby, R. M., Hopkin, S. P., Peakall, D. B. (2012). *Principles of Ecotoxicology* (4th ed). CRC press.

215. Wang, X., Zhu, X., Peng, Q., Wang, Y., Ge, J., Yang, G., Wang, X., Cai, L., Shen, W. (2019). Multi-level ecotoxicological effects of imidacloprid on earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 219, 923–932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.001>
216. Wang, Y., Wu, S., Chen, L., Wu, C., Yu, R., Wang, Q., Zhao, X. (2012). Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 88(4), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.086>
217. Warne, M. S. J. (2003). A Review of the Ecotoxicity of Mixtures, Approaches to, and Recommendations for, their Management. U Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination (Editors: Langley A, Gilbey M and Kennedy B). NEPC Service Corporation.
218. Wiklund, A.-K. E., Breitholtz, M., Bengtsson, B.-E., Adolfsson-Erici, M. (2012). Sucralose – An ecotoxicological challenger? *Chemosphere*, 86(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.049>
219. Xiangwei Zhu. (2022). mixtox: Dose Response Curve Fitting and Mixture Toxicity Assessment (Verzija 1.4.0, str. 1.4.0) [Software]. <https://CRAN.R-project.org/package=mixtox>
220. Yachi, S., Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1463–1468. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>
221. Yadav, J., Singh, D., Shefali, S. (2020). Effect of chlorpyrifos and carbofuran on morphology, behavior and acetylcholinesterase activity of earthworm (*Eisenia fetida*). *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 90(10), 1871–1876. <https://doi.org/10.56093/ijas.v90i10.107887>
222. Yadav, R., Kumar, R., Gupta, R. K., Kaur, T., Kiran, Kour, A., Kaur, S., Rajput, A. (2023). Heavy metal toxicity in earthworms and its environmental implications: A review. *Environmental Advances*, 12, 100374. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100374>
223. Yang, P., Takahashi, H., Murase, M., Itoh, M. (2021). Zebrafish behavior feature recognition using three-dimensional tracking and machine learning. *Scientific Reports*, 11(1), 13492. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92854-0>
224. Yeardley, R. B., Gast, L. C., Lazorchak, J. M. (1996). The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(9), 1532–1537. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150915>

225. Yin, J., Long, Y., Xiao, W., Liu, D., Tian, Q., Li, Y., Liu, C., Chen, L., Pan, Y. (2023). Ecotoxicology of microplastics in *Daphnia*: A review focusing on microplastic properties and multiscale attributes of *Daphnia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114433. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114433>
226. Yuan, S., Liang, C., Li, W., Letcher, R. J., Liu, C. (2021). A comprehensive system for detection of behavioral change of *D. magna* exposed to various chemicals. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123731. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123731>
227. Zaller, J. G., Brühl, C. A. (2019). Editorial: Non-target Effects of Pesticides on Organisms Inhabiting Agroecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 75. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00075>
228. Zein, M. A., McElmurry, S. P., Kashian, D. R., Savolainen, P. T., Pitts, D. K. (2014). Optical bioassay for measuring sublethal toxicity of insecticides in *Daphnia pulex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 144–151. <https://doi.org/10.1002/etc.2404>
229. Zein, M. A., McElmurry, S. P., Kashian, D. R., Savolainen, P. T., Pitts, D. K. (2015). Toxic effects of combined stressors on *Daphnia pulex*: Interactions between diazinon, 4-nonylphenol, and wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1145–1153. <https://doi.org/10.1002/etc.2908>
230. Zhang, X., Xia, P., Wang, P., Yang, J., Baird, D. J. (2018). Omics Advances in Ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 52(7), 3842–3851. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06494>
231. Zhao, L., Au, J. L.-S., Wientjes, G. (2010). Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Frontiers in Bioscience*, E2(1), 241–249. <https://doi.org/10.2741/e86>

Web izvori:

Web-1: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID4020458>

Web-2: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID1024122>

Web-3: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID9032327>

Web-4: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID5032442>

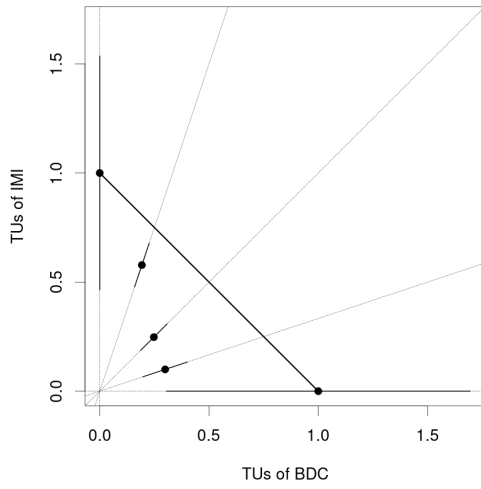
Web-5: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID9032113>

Web-6: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID4032372>

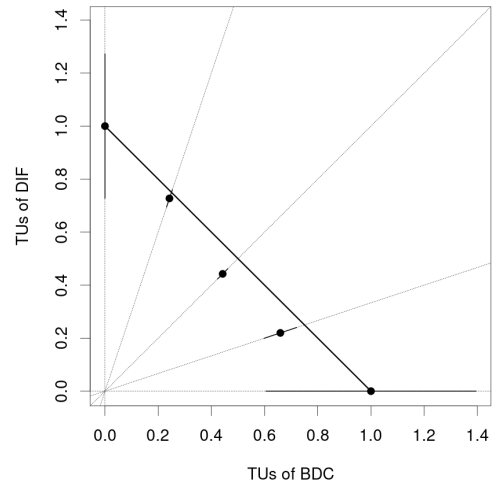
Web-7: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID8032548>

PRILOG 1 - Izobologrami interakcija binarnih mješavina

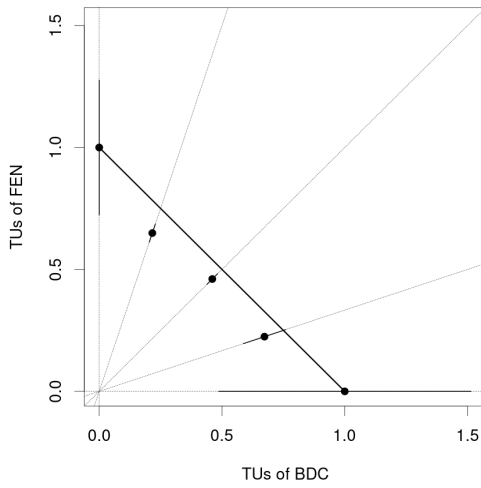
Isobole of BDCxIMI mixtures



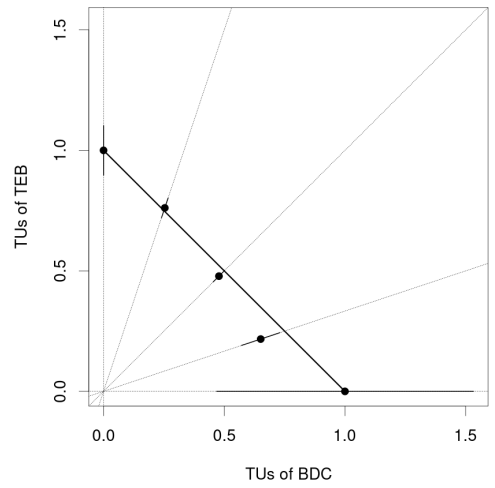
Isobole of BDCxDIF mixtures



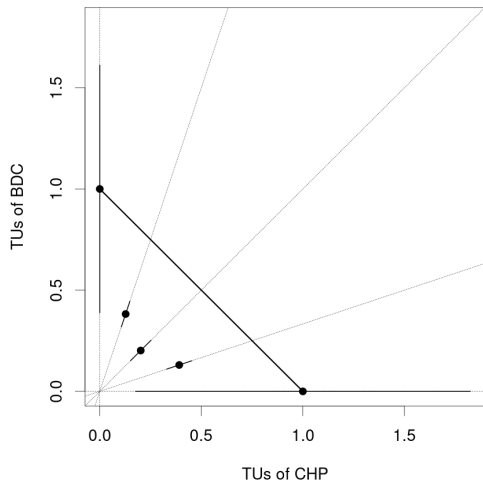
Isobole of BDCxFEN mixtures



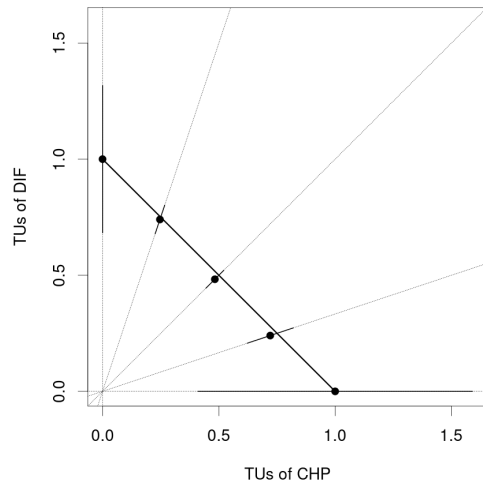
Isobole of BDCxTEB mixtures



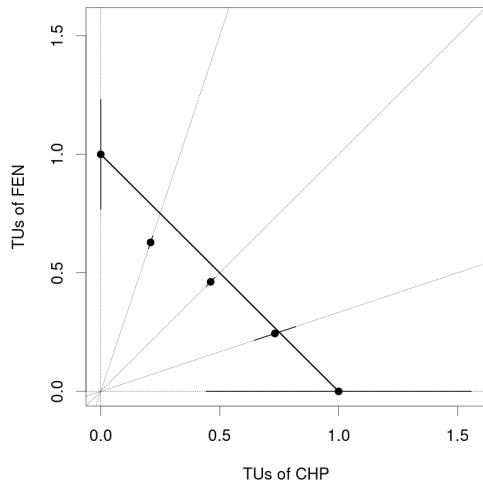
Isobole of CHPxBDC mixtures



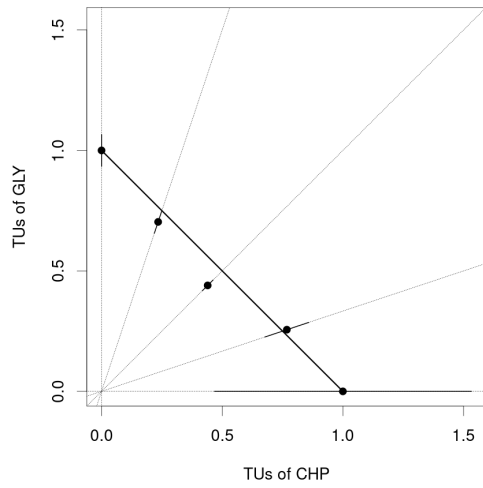
Isobole of CHPxDIF mixtures



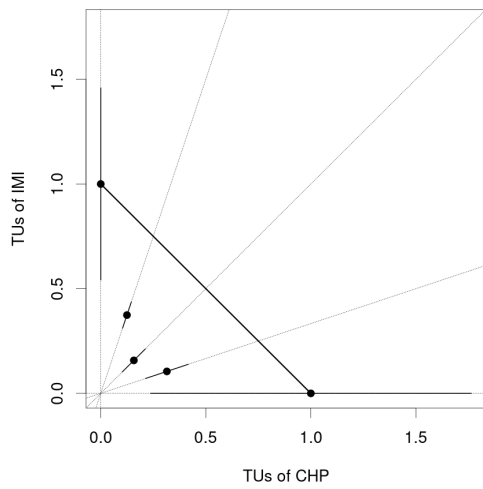
Isobole of CHPxFEN mixtures



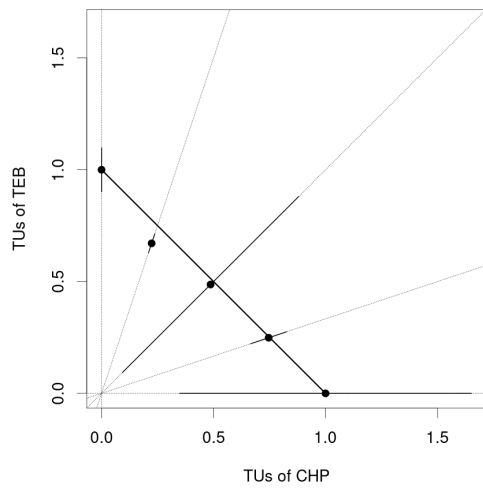
Isobole of CHPxGLY mixtures



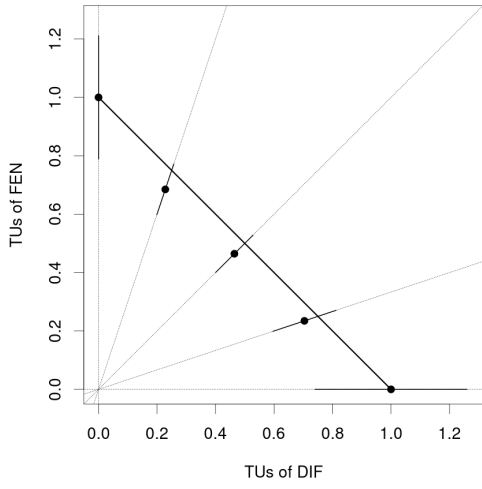
Isobole of CHPxIMI mixtures



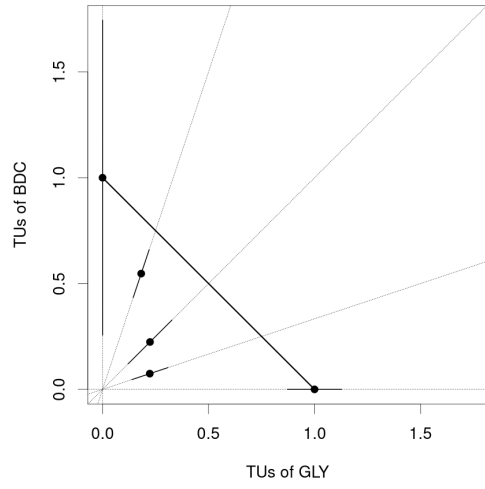
Isobole of CHPxTEB mixtures



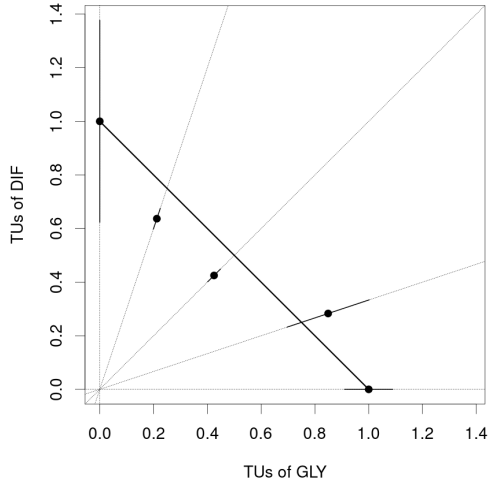
Isobole of DIFx FEN mixtures



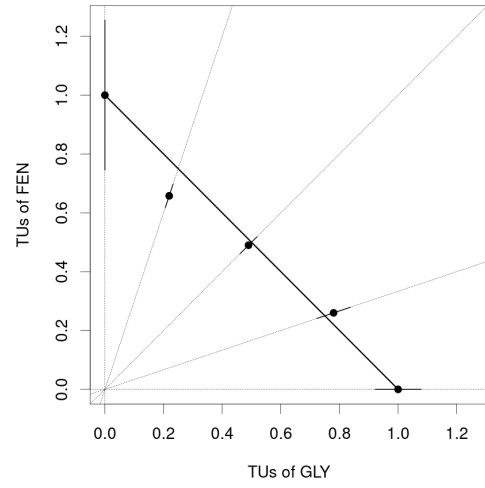
Isobole of GLYxBDC mixtures



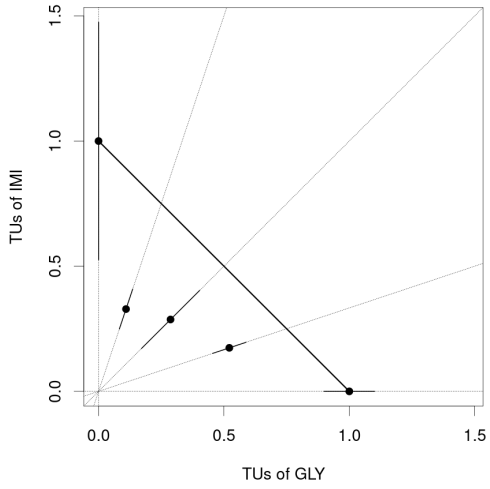
Isobole of GLYxDIF mixtures



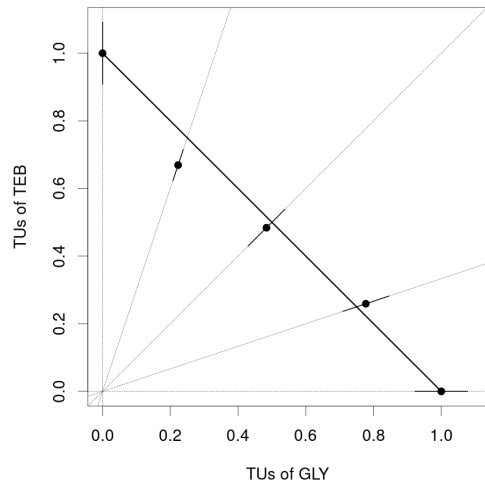
Isobole of GLYxFEN mixtures



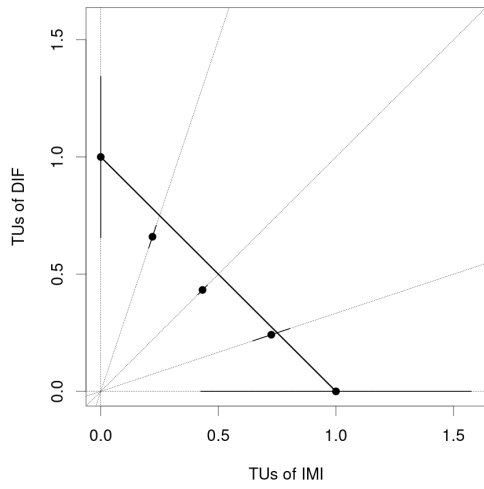
Isobole of GLYxIMI mixtures



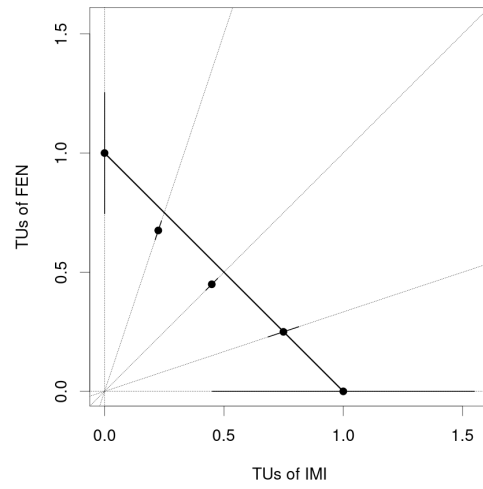
Isobole of GLYxTEB mixtures



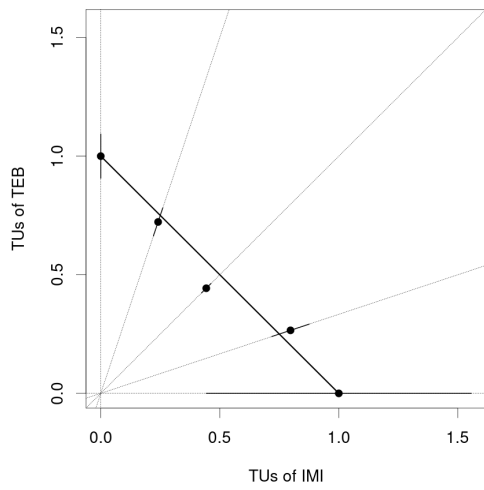
Isobole of IMixDIF mixtures



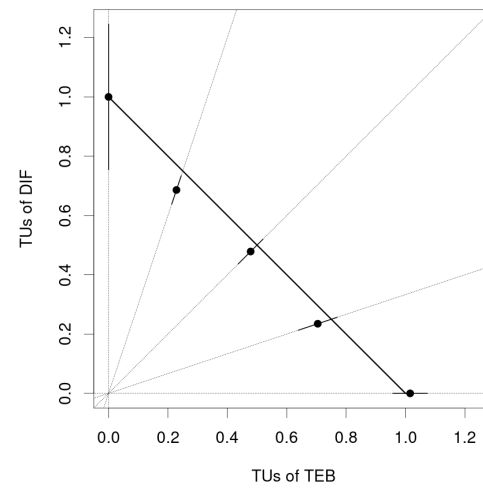
Isobole of IMixFEN mixtures



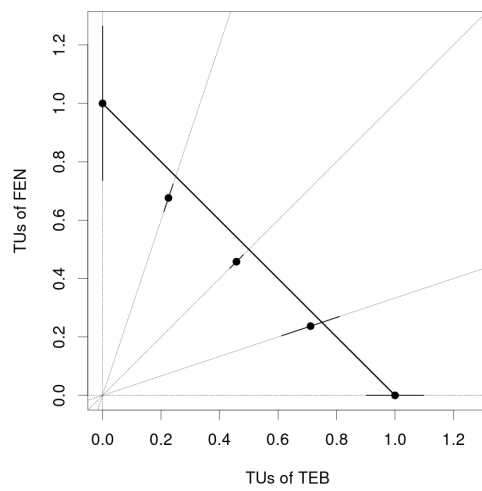
Isobole of IMixTEB mixtures



Isobole of TEBxDIF mixtures



Isobole of TEBxFEN mixtures



ŽIVOTOPIS

Tamara Đerđ rođena je 1996. godine. Završila je Sveučilišni prijediplomski studij Biologija i Sveučilišni diplomski studij Biologija; smjer: znanstveni na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Tijekom studija nagrađena je s tri pročelnikove i dvije rektorove nagrade. Doktorski studij Biologije upisala je 2020. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2020. godine zaposlena je kao asistent na Odjelu za biologiju Sveučilišta u Osijeku. Sudjeluje u izvođenju praktične nastave iz predmeta Kvantitativna biologa, Kvantitativna biologija 2, Kvantitativna ekologija i Ekološko modeliranje i predviđanje. Uz nastavne obveze i istraživački rad, sudjelovala je i u praktičnim radionicama i školama koje su organizirali ESA, NASA i IEEE, s fokusom na daljinska istraživanja Zemlje. Radionice su održane pod vodstvom svjetski priznatih stručnjaka, omogućujući usvajanje naprednih znanja i vještina u ovom području. Članica je međunarodnog društva za ekološko modeliranje ISEM (International Society for Ecological Modelling). U proteklih približno deset godina aktivnog sudjelovanja u znanstveno-istraživačkom radu Zavoda za kvantitativnu ekologiju imala je prilike sudjelovati u provedbi preko deset stručnih i znanstvenih projekata te u diseminaciji proizašlih rezultata. Koautorica je 7 znanstvenih radova, preko 30 sažetaka sa pretežito međunarodnih znanstvenih skupova te jednog poglavlja u knjizi.