

# Utjecaj pesticida karbendazima na preživljenje i populacijsku dinamiku vrste *Euglena viridis*

---

Gulan, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:136234>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Marija Gulan**

**UTJECAJ PESTICIDA KARBENDAZIMA NA PREŽIVLJENJE I POPULACIJSKU  
DINAMIKU VRSTE *EUGLENA VIRIDIS***

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2017. godina**

Ovaj rad je u Laboratoriju za toksikologiju okoliša na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre ekologije i zaštite prirode.

*Zahvaljujem svojem mentoru Izv. prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na utrošenom vremenu, savjetima, trudu i strpljenju tokom eksperimentalnog dijela ali i tokom pisanja ovoga rada. Uz to, zahvaljujem se svima na Zavodu za animalnu fiziologiju na stručnoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Zahvaljuje se svojim kolegicama, Ivani i Sunčici, na dobrom društvu, savjetima te pomoći tokom studiranja.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj najboljoj prijateljici i cimerici Tini i svom dečku Josipu koji su mi bili oslonac i bodrili me tijekom studiranja.*

*Veliko hvala mojoj sestri Tanji koja je uvijek uz mene kroz sve moje hirove, uspone i padove. Hvala Ti što si bila glas razuma.*

*Na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima koji su omogućili studiranje i bili mi potpora kroz cijelo moje obrazovanje. Hvala im na razumijevanju i strpljenju.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### UTJECAJ PESTICIDA KARBENDAZIMA NA PREŽIVLJENJE I POPULACIJSKU DINAMIKU VRSTE *EUGLENA VIRIDIS*

Marija Gulan

Rooseveltov trg 6, Zagreb

#### SAŽETAK

Karbendazim je fungicid širokog spektra koji spada u skupinu benzimidazolnih spojeva i djeluje na način da inhibira diobu stanica. Postojan je i slabo topljiv u vodi te nakon tretiranja uzgajanih kultura zaostaje u hrani, predstavlja zdravstveni rizik za ljude i okoliš. Relativno su dobro poznati literaturni navodi o toksičnosti ovog pesticida i njegov utjecaj na ljudsko zdravlje. S obzirom da je utjecaj karbendazima na organizme vodenih ekosustava nedovoljno istražen, posebice na vrstama koje zauzimaju važnu ulogu u trofičkim lancima, cilj ovoga rada je istražiti potencijalno toksično djelovanje karbendazima na vrstu *E. viridis*. Čista kultura vrste tretirana je različitim rasponom doza karbendazima tijekom 18 dana pri čemu se pratila brojnost populacije. Pri akutnim koncentracijama, tijekom 24 sata karbendazim u koncentracijama od 0.1 nM do 100 nM ne uzrokuje smrtnost populacije, dok sve doze iznad 450 µM uzrokuju smrt kod 90–100 % euglena u populaciji. Utvrđena LC<sub>50</sub> doza karbendazima za euglenu je 306,35 µM. Povećanje aktivnosti enzima SOD javlja se pri 200 µM koncentraciji u odnosu na kontrolnu grupu što je u skladu sa porastom intenziteta fluorescencijske boje DHE, koja ukazuje na blago povećanje razine superoksidnog aniona.

(53 stranica, 25 slika, 11 tablica, 67 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.

**Ključne riječi:** karbendazim, *Euglena viridis*, toksičnost, populacijska dinamika,

**Voditelj:** Izv. Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

**Ocjenitelji:** Izv. Prof. dr. sc. Marko Miliša,

Izv. Prof. dr. sc. Antun Alegro

**Rad prihvaćen:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### THE IMPACT OF THE PESTICIDE CARBENDAZIM ON THE SURVIVAL AND POPULATION DYNAMICS OF *EUGLENA VIRIDIS*

Marija Gulan

Rooseveltovej trg 6, Zagreb

#### ABSTRACT

Carbendazim is a wide spectrum fungicide belonging to the group of benzimidazole compounds and its mechanism of action is inhibition of cell division. It is persistent and poorly soluble in water and after the treatment of cultured crops lags behind in food and can represent a health risk for humans and the environment. There are relatively well-known literary allegations about the toxicity of this pesticide and its impact on human health. Since the influence of carbendazim on aquatic organisms is insufficiently explored, especially on species that play an important role in trophic chains, the aim of this study is to investigate the potentially toxic effects of carbendazim on *E. viridis*. The pure culture was treated with a different range of carbendazim doses within 18 days, with the population count being monitored. At acute concentrations, within 24 hours carbendazim at concentrations of 0.1 nM to 100 nM does not cause population mortality, while all doses above 450 µM cause death in 90-100 % euglena in the population. Determined LC<sub>50</sub> dose of carbendazole for eugenas is 306,35 µM. Increasing activity of SOD enzymes occurs at 200 µM concentration in relation to the control group, which is consistent with the increase in intensity of the fluorescence dye DHE, which indicates a slight increase in the level of the superoxide anion.

(53 pages, 25 figures, 11 tables, 67 references, original in Croatian language)

Thesis deposit in: Central Library of Department of Biology, Rooseveltov trg 6.

**Key words:** carbendazim, *Euglena viridis*, toxicity, population dynamics.

**Supervisor:** Assoc. prof. Domagoj Đikić

**Reviewers:** Assoc. prof. Marko Miliša,

Assoc. prof. Antun Alegro

**Thesis accepted:**

## **POPIS KRATICA**

<b>DOM</b>	Otopljena organska tvar
<b>GO</b>	Grafenov oksid
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija
<b>FAO</b>	Organizacija za prehranu i poljoprivredu
<b>EFSA</b>	Europska agencija za sigurnost hrane
<b>NOAEL</b>	Doza kod koje nema učinka
<b>LOAEL</b>	Najniža doza koja ne uzrokuje oštećenje
<b>ADI</b>	Prihvatljiv dnevni unos
<b>ARfD</b>	Akutna referentna doza
<b>LC50</b>	Doza koja ubija 50 % test-populacije
<b>MTS</b>	Tetrazolijeva sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij)
<b>SOD</b>	Super oksid dismutaza
<b>LDH</b>	Laktat dehidrogenaza
<b>BTEX</b>	Benzen Toluen Etilbenzen Ksilem
<b>IUPAC</b>	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju
<b>FERA</b>	Agencija za istraživanje hrane i okoliša
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>IPCS</b>	Međunarodni program kemijske sigurnosti
<b>5 - HBC</b>	Metil – 5 – hidroksibenzimidazol – 2 – ilkarbamat
<b>CAT</b>	Aktivnost katalaze
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>OD</b>	Optička gustoća

# SADRŽAJ

<b>1. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Protisti u ekološkim zajednicama i hranidbenoj mreži .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. <i>Euglena viridis</i> i uloga u ekološkim zajednicama praživotinja u prirodi .....</b>	<b>2</b>
1.2.1.    Sistematika vrste <i>E. viridis</i> .....	2
1.2.2.    Obilježja vrste <i>E. viridis</i> .....	3
1.2.2.1.    Fiziologija vrste <i>E. viridis</i> .....	4
1.2.2.2.    Reprodukcija i životni ciklus .....	5
1.2.2.3.    Populacijska dinamika .....	7
<b>1.3. <i>Euglena viridis</i> kao pokusni organizam u laboratorijskim uvjetima i ekotoksikološka istraživanja.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Utjecaj pesticida na populacije praživotinja u prirodi .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5. Laboratorijska istraživanja utjecaja pesticida na praživotinje .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Karbendazim .....</b>	<b>11</b>
1.6.1.    Kemijska struktura .....	12
1.6.2.    Primjena i količine u okolišu.....	14
1.6.3.    Toksikologija.....	14
1.6.4.    Istraživanja utjecaja karbendazima na prirodnim populacijama praživotinja.....	20
<b>1.7. Cilj istraživanja .....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Uspostavljanje starter kulture vrste <i>E. viridis</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Praćenje brojnosti populacije <i>E. viridis</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Priprava radne otopine karbendazima .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4. Određivanje letalne koncentracije LC<sub>50</sub> .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5. Praćenje biokemijskih promjena .....</b>	<b>24</b>
2.5.1.    Laktat – dehidrogenaza (LDH) test izloženosti <i>E. viridis</i> različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti .....	24

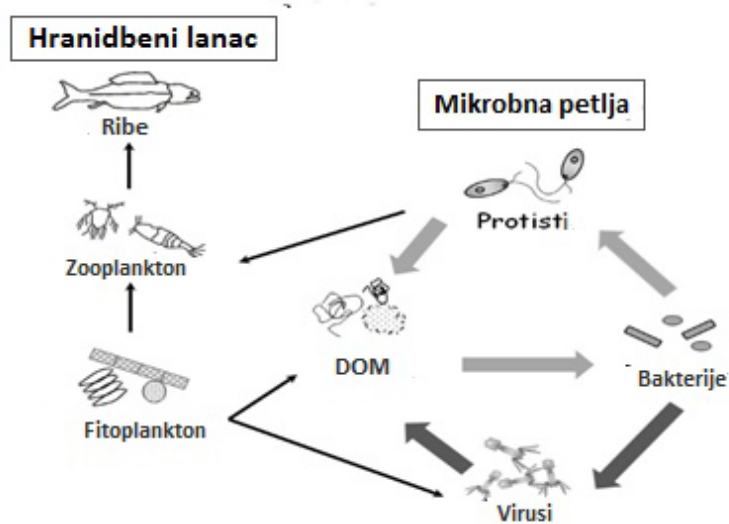


2.5.2.	MTS test izloženosti <i>E. viridis</i> različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti	26
2.5.3.	Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod <i>E. viridis</i> pri različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti .....	28
<b>2.6.</b>	<b>Priprema uzoraka za fluorescencijsko-mikroskopsku detekciju .....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.</b>	<b>Akutno izlaganje populacije <i>E. viridis</i> pesticidom karbendazimom, brojnost stanica i LC<sub>50</sub></b>	<b>30</b>
<b>3.2.</b>	<b>Deskriptivni podaci vijabilnosti populacije <i>E. viridis</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.</b>	<b>Rezultati brojnosti euglena u zatvorenoj laboratorijskoj populaciji i trovanja tijekom 18 dana izloženosti pesticidu karbendazimu .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.</b>	<b>Enzimi .....</b>	<b>35</b>
3.4.1.	LDH test izloženosti <i>E. viridis</i> .....	35
3.4.2.	MTS test izloženosti <i>E. viridis</i> .....	37
3.4.3.	Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod vrste <i>E. viridis</i> .....	38
<b>3.5.</b>	<b>Fluorescencijsko-mikroskopska detekcija intracelularne razine slobodnih radikala superoksidnog aniona fluorescentnom bojom DHE i razine vodikovog peroksida bojom H<sub>2</sub>DCF u <i>E. viridis</i> pri različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 4 sata izloženosti. .</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>53</b>

# 1. LITERATURNI PREGLED

## 1.1. Protisti u ekološkim zajednicama i hranidbenoj mreži

Protisti (Protozoa) su važna karika u hranidbenoj mreži gdje ima veliki utjecaj na prijenos biomase (Sigeo, 2005). Mikrobna petlja je jedan od puteva u hranidbenoj mreži sastavljena od bakterija koje direktno iskorištavaju DOM (eng. Dissolved Organic Matter) te različitih praživotinja koje se njima hrane (Slika 1.). Na ovaj se način DOM, nutrijenti i minerali prenose na više trofičke razine gdje se dalje iskorištavaju. Putem mikrobne petlje mogu kontrolirati bakterijske populacije i populacije algi i tako limitirati mogućnost prekomjernog rasta njihovih populacija.



**Slika 1.** Shematski prikaz hranidbenog lanca i mikrobne petlje (preuređeno i preuzeto sa <http://bg.aori.u-tokyo.ac.jp/en/2016/03/16/report08/>)

Protisti u ekosustavu predstavljaju vezu između organske tvari i organizama na viši trofičkim razinama, budući da se hrane bakterijama koje sudjeluju u procesu razgradnje ostataka mrtvih biljaka i životinja. Raspadanje organske tvari je važan ekološki proces koji omogućuje ponovno vraćanje nutrijenata i minerala u okoliš.

Nadalje, mogu se koristiti kao svojevrсни bioindikatori, organizmi koji se koriste za praćenje zdravlja i cjelovitosti okoliša. Prisutnost ili odsutnog specifičnih praživotinja u okolišu može ukazivati na ekološku neravnotežu ili poremećaj, kao što je zagađenje. Neke praživotinje se mogu uzorkovati iz određenog medija i potom analizirati na prisutnost otrovnih tvari, budući da vrlo dobro akumuliraju toksine iz okoliša. Osim toga, njihove

stanične strukture se također mogu proučavati u svrhu otkrivanja štete ili drugih abnormalnosti koje mogu biti uzrokovane onečišćenjem (Sigeo, 2005).

## **1.2. *Euglena viridis* i uloga u ekološkim zajednicama praživotinja u prirodi**

### **1.2.1. Sistematika vrste *E. viridis***

Euglene je mikroskopom opažao, a zatim opisao nizozemski istraživač Antoni van Leeuwenhoek 1674. godine. Dvadeset godina kasnije, vrstu je opisao i John Harris. Mmedutim potpuniji opis organizma dao je O.F. Müller 1786. godine kada joj daje ime *Cercaria viridis*, uočavajući njenu karakterističnu boju i promjenjiv oblik tijela. Müller je također pružio niz ilustracija, koji točno opisuju valovite, kontraktilne pokrete eugleninog tijela. Godine 1830. C.G. Ehrenberg je preimenovao Müller-ovu *Cercaria viridis* i svrstao je, u skladu s kratkotrajnim klasifikacijskim sustavom koji je osmislio, među više – želučane organizme (Polygastrica) u porodicu Astasiaea (Ehrenberg, 1830). Upotrebom tek izumljenog akromatskog mikroskopa, Ehrenberg je vidio eugleninu očnu pjegu, koju je ispravno prepoznao kao "rudimentarno oko". Ova je značajka ugrađena u Ehrenbergovo ime za novi rod, sastavljena od korijena grčkih riječi "eu" (dobro, dobro) i glēnē (očne jabučice). Ehrenberg nije primijetio euglenin bič, kojega je prvi put prepoznao i opisao Félix Dujardin 1841 godine te dodao svojstvo biča u kriterije pri opisu roda. Za taksonome je dugo vremena predstavljala problem u klasifikaciji protista, budući da sadrži obilježja i biljaka i životinja. Postoji daleka, ali jasna veza sa zelenim algama; Euglenaceae sa fotosintetskim pigmentima jedini su organizmi uz Chlorophyceae i više biljke koje sadrže klorofil a i klorofil b.

Klasifikacija: (izvor: AlgaeBase)

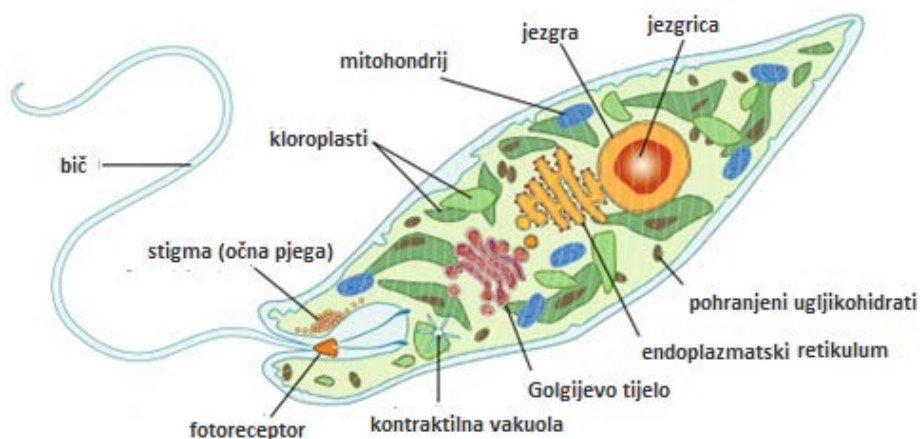
- Domena: Eukariota
- Carstvo: Protozoa
- Podcarstvo: Eozoa
- Koljeno: Euglenophyta
- Podkoljeno: Euglenoida
- Razred: Euglenophyceae
- Red: Euglenales
- Porodica: Euglenaceae
- Rod: *Euglena*
- Vrsta: *Euglena viridis* O.F.Müller (Ehrenberg), 1830.

### 1.2.2. Obilježja vrste *Euglena viridis*

*Euglena viridis* je solitarni i slobodnoživući organizam, karakterističan za slatkovodne bare, jezera i manje potoke premda se može naći i u slanim vodama. Često nastanjuje okoliš bogat vegetacijom npr. ribnjake. Najčešće živi s drugim vrstama roda, a ako je populacija izraženo brojna daje zelenkastu boju u vodu ili formira zeleni film na površini jezera. *E. viridis* je primarni proizvođač i zauzima važnu ulogu u hranidbenom lancu, a ujedno je i bioindikator kakvoće vode (Ellen, 1922).

*E. viridis* je jedinstveni predstavnik bičaća (Mastigophorea; Diesing, 1866), skupine protista s jednom ili više protoplazmatskih izraslina, kojima se gibaju i primaju podražaje. Zbog jedinstvenih obilježja, često se raspravljalo o tome u kojem bi se koljenu euglena trebala pripadati. Razlog za grupiranje s algama je prisutnost kloroplasta u stanici. Vrsta je prepoznatljiva po izduženom vretenastom obliku, blago je zaobljena anteriorno dok se posteriorno sužavaju oblikujući vrh. Dimenzije stanice su: duljina 40–60 µm i promjer 10–18 µm (Slika 2.).

Sadrži brojne kloroplaste (organele u kojima se odvija fotosinteza) koji sadrže klorofil, kontraktilne vakuole (organel koji regulira citoplazmu), očnu pjegu i jedan ili dva biča. Bič je iste duljine kao i tijelo ili malo dulji. Tijela paramilona su jajoliki kratki štapići, duljine do 5 µm i uglavnom su raspoređeni oko središnjeg dijela grupiranog kloroplasta.



**Slika 2.** Građa *E. viridis* (preuređeno i preuzeto sa <https://www.britannica.com/science/Euglena>).

Prisutna je u slatkovodnom okolišu i preferira vodu bogatu organskim tvarima. Zbog relativno lakog uzgoja u laboratoriju, euglena je tipični modelni organizam u raznim istraživanjima.

### 1.2.2.1. Fiziologija vrste *E. viridis*

Mogućnost samostalnog kretanja iznimno je važno za mikroorganizme pa tako i euglenu, budući da takvi organizmi imaju prednost prilikom hranjenja i u kontaktu su s većim okolišem, za razliku od sesilnih organizama. Kretanje kroz okoliš omogućava lakši pristup nutrijentima i stoga ima ključnu ulogu u preživljavanju. Kod euglene se mogu prepoznati flagelarno kretanje kod kojega bič ima direktnu ulogu u kretanju organizma i relativno je brzo (3.6 mm/min) (Kershaw, 1988) i euglenoidno kretanje uslijed niza kontrakcija.

Princip flagelnog pokretanja temelji se na seriji lateralnih kretanja dužeg biča, pri čemu se stvaraju valovi koji putuju od baze prema vrhu tijela i guraju organizam prema naprijed (Jordan i Verma, 2009). Ovakvo kretanje stvara dvije sile, jednu paralelnu a drugu okomitu na glavnu os tijela euglene. Sila koja djeluje paralelno gura organizam naprijed, dok sila koja djeluje pod pravim kutom rotirati organizam oko vlastite osi (Gray, 1928). Energija za kontrakciju bičeva dolazi od ATP-a koji se proizvodi u mitohondrijima kinetosoma. Drugi način kretanja je euglenoidno pokretanje koje nastaje kao rezultat strujanja citoplazme unutar granica elastične pelikule. Euglenoidno kretanje podrazumijeva mijenjanje oblika tijela uslijed niza kontrakcija. Peristaltički valovi nastali kontrakcijom i ekspanzijom prolaze kroz čitavo tijelo organizma, od anteriornog do posteriornog kraja, zbog čega se životinja kreće prema naprijed (Loendes, 1944; Holwill, 1966). Ovakav način kretanja ima ograničene pokrete, odvija se sporo i ovisi o pelikuli koja se može deformirati. Euglenoidni pokreti uzrokovani su kontrakcijom citoplazme ili kontrakcijom mionema (kontraktilni endoplazmatski organel) prisutnih u citoplazmi ispod pelikule, međutim točan mehanizam ovog pokretanja nije u potpunosti razjašnjen (Kershaw, 1988).

*E. viridis* je miksotrof, što znači da do hrane može doći heterotrofno ili autotrofno. Holofitsko ili autotrofno hranjenje je ujedeno i najčešći način ishrane kod euglene koji je sličan načinu ishrane biljaka. Autotrofni način hranjenja temelji se na iskorištavanju jednostavnih kemijskih elemenata poput CO<sub>2</sub> ili vode, koje se uz pomoć sunčeve svjetlosti i klorofila u kromatoforama pretvaraju u složene šećere kako bi stvorile potrebnu hranu za metabolizam (fotosinteza). Produkt asimilacije je spoj paramilum, ugljikohidrat sličan škrobu, ali za razliku od njega s jodom ne daje plavu boju. Nastaje u pirenoidima, koji se nalaze na kloroplastu (Calvayrac i sur., 1981). Višak hrane pohranjuje se u izduženim paramilumskim tijelima koji pod mikroskopom mogu biti vidljivi kao bijele ili prozirne čestice. Upravo preko paramilumskih tijela moguća je identifikacija vrste, budući da se mogu koristiti kao taksonomsko obilježje (Monfils i sur., 2011). Pod autotrofni tip ishrane spada i holozoički

način hranjenja, gdje organizam procesom fagocitoze unosi krupnije čestice hrane nakon čega se odvija proces razgradnje i unutarstanične probave. Fagocitoza se smatra primitivnim načinom ishrane za ovu vrstu (Tannreuther, 1923). Drugi način hranjenja euglena je saprofitski u uvjetima kada nema dovoljno svjetla za autotrofnu prehranu. Na ovaj način apsorbira organsku hranu iz otopine preko površine tijela, a kao izvor hrane služi se amonijevim solima i nitratima kao primarnim izvorima dušika. Saprofitski način prehrane koristi kada izgubi klorofil u nedostatku svjetla, ovaj proces najčešće je reverzibilan i u uvjetima kad ima dovoljno svjetla klorofil se obnavlja. Međutim kod vrste *Euglena gracilis* ovo nije slučaj te jednom kad izgubi klorofil više ga ne može obnoviti (Pringsheim i Hovasse, 1948).

Izmjena plinova kod zelenog bičaća odvija se difuzijski preko površine tijela, pri čemu apsorbira otopljeni kisik iz okolne vode i istovremeno izbacuje CO<sub>2</sub>. Pretpostavka je da se tokom dana, kisik oslobođen procesom fotosinteze iskorištava u svrhu respiracije te da se ugljični dioksid iskorišten u staničnom disanju koristi za fotosintezu. Premda se eliminacija CO<sub>2</sub> i amonijaka odvija difuznim putem, neki se ekskreti poput vode izbacuju iz tijela pomoću kontraktilne vakuole mehanizmom osmoregulacije. Budući da je euglene prekrivena polu-propusnom pelikulom, voda iz okoliša konstantno prodire u organizam, gdje se nakuplja u citoplazmi. Voda se iz citoplazme sakuplja preko pomoćnih vakuola nakon čega se oslobađa u glavnu kontraktilnu vakuolu. Volumen kontraktilne vakuole postupno se povećava te se uslijed velikog pritiska rasprsnje i tjera vodu u rezervoar (tzv. "ždrijelo") koja potom iz tijela izlazi pomoću citosoma. Uz vodu ujedno se izbacuju i ostali ekskreti koji su topljivi u vodi. Kontraktilna vakuola ima fazu dijastole (primanje vode) i fazu sistole (izbacivanje vode). Količina izbačene vode i stopa kontrakcija ovisi o osmolarnosti životne sredine.

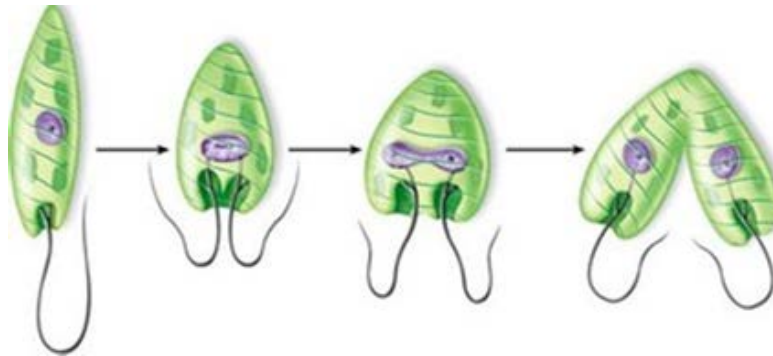
#### **1.2.2.2. Reprodukcijski i životni ciklus**

*E. viridis* razmnožava se nespolno, uzdužnim dijeljenjem koje započinje na prednjem dijelu tijela životinje. Postoji više načina na koje se razmnožava tj. dijeli.

##### **(i) Longitudinalna binarna dioba**

Karakterističan proces reprodukcije vrste ukoliko su prisutni povoljni uvjeti vode, temperature i dostupnost hrane. Kod binarne diobe proces odvajanja počinje na anteriornom kraju, a završava prema posteriornom kraju, pri čemu je ravnina diobe paralelna s uzdužnom osi tijela organizma (Slika 3.). Binarnom diobom roditeljska stanica dijeli se na dvije simetrotropne ili zrcalno slične kćeri. Jezgra se dijeli mitozom unutar jezgrine membrane, dok se istovremeno endosom produžuje transverzalno i sužavanjem dijeli na dva otprilike jednaka

dijela. Organeli koji se nalaze anteriorno poput stigme, citofarinksa i kromatofora također se dijele. Stari bič skraćuje se za pola dužine, dok se novi razvija iz druge kontraktilne vakuole (Leedale, 1968).



**Slika 3.** Binarne diobe *E. viridis* (preuzeto sa <http://keywordsuggest.org/content/427439-euglena-reproduction.html>).

(ii) Višestruka dioba

Ovakva dioba karakteristična je za euglene kada se nalazi u obliku ciste, odnosno kada su okolišni uvjeti nepovoljni. Citoplazma i jezgra prolaze kroz mnogostruka mitotska dijeljenja pri čemu može nastati od 16 do 32 stanice kćeri. Kada nastupe povoljni uvjeti cista se raspada, a iz nje se oslobađaju stanice kćeri koje potom razvijaju ostale organele potrebne za daljnji život. Euglena se tokom životnog ciklusa može pojaviti u flagelarnom obliku, palmela obliku ili u obliku ciste. Kod slobodno plivajućeg flagelarnog oblika euglena se slobodno kreće uz pomoć biča. Palmela oblik nastupa u nepovoljnim uvjetima kao što je nedostatak kisika, hrane i svjetlosti. Da bi preživjele nepovoljne uvjete, skupljaju se u velikom broju i formiraju kolonije. Euglene gube bič, postaju nepokretne i prekrivene su sluzavim matriksom, koji na površini vode izgleda kao želatinozni zeleni film. Individue u palmela fazi nastavljaju sa metaboličkim aktivnostima i razmnožavaju se binarnom diobom. Nastupanjem povoljnih uvjeta, želatinozni film koji prekriva površinu vode bubri zbog apsorpcije vode i euglene se oslobađaju, obnavljaju svoj bič i nastavljaju normalno životni ciklus. Euglena se u obliku spore (ciste) može pojaviti u tri funkcionalno različita oblika (Hindak i sur. 2000):

(i) Privremena ili tranzitna spora koja označava fazu mirovanja. Stanična membrana je kruta, ali nije potpuno zatvorena i euglena se može kretati.

(ii) Zaštitna spora se formira u nedostatku hrane ili drugim nepovoljnim uvjetima. Stanična membrana često slojevita i debela. Cista sadrži samo jednu stanicu.

(iii) Reproduktivna spora koja se formira kako bi se organizam zaštitio dok se razmnožava.

### 1.2.2.3. Populacijska dinamika

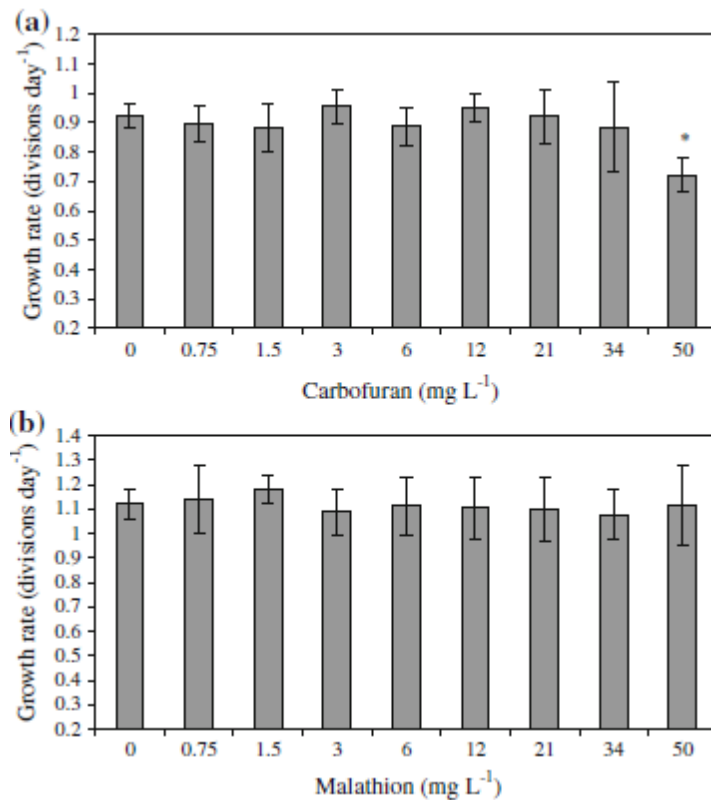
Prema dostupnim izvorima i pretraživanjem različitih baza, nisu pronađeni radovi koji govore o populacijskoj dinamici vrste *E. viridis* u laboratorijskim ili prirodnim uvjetima.

### 1.3. *Euglena viridis* kao pokusni organizam u laboratorijskim uvjetima i ekotoksikološka istraživanja

Istraživanje utjecaja teških metala na odabranim vrstama algi, među kojima je i *E. viridis* ispitala su utjecaj cinka i kobalta na inhibiciju rasta, akumulaciju i postotak unosa metala (Coleman i sur., 2015). *E. viridis* uzgajana je na BBM mediju, koji je sadržavao soli cinka ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) i kobalt ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ). Otopine cinka i kobalta kojima su se tretirale čiste kulture bile su 2 x, 4 x, 10 x i 20 x koncentriranije u odnosu na BBM medij. Nakon tretiranja čistih kultura *E. viridis* 2 x koncentriranom otopinom cinka zabilježen je rast populacije euglena, dok se pri 4 x koncentriranoj otopini cinka rast euglena usporava. Međutim kod 10 x i 20 x koncentrirane otopine ovog metala dolazi do značajne inhibicije rasta populacije. Sve koncentracije otopine kobalta inhibiraju rast kod sve tri vrste algi, pa tako i kod *E. viridis*. Također je zapaženo da izlaganje *E. viridis* visokim koncentracijama metala cinka i kobalta dovodi do njihove akumulacije, pri čemu koncentracija metala u stanici raste proporcionalno sa porastom koncentracije metala u mediju. Veći postotak unosa metala iz otopine kod euglene je zabilježen kod 4 x i 10 x koncentriranim otopinama cinka, dok je kod kobalta nešto veća vrijednost koncentracije od 15 x do 20 x. Kod euglena je opažen manji unos kobalta, nego cinka što se može pripisati stvaranju kompleksa između kobalta i fotosintetskih spojeva (Scott i Ericson, 1955).

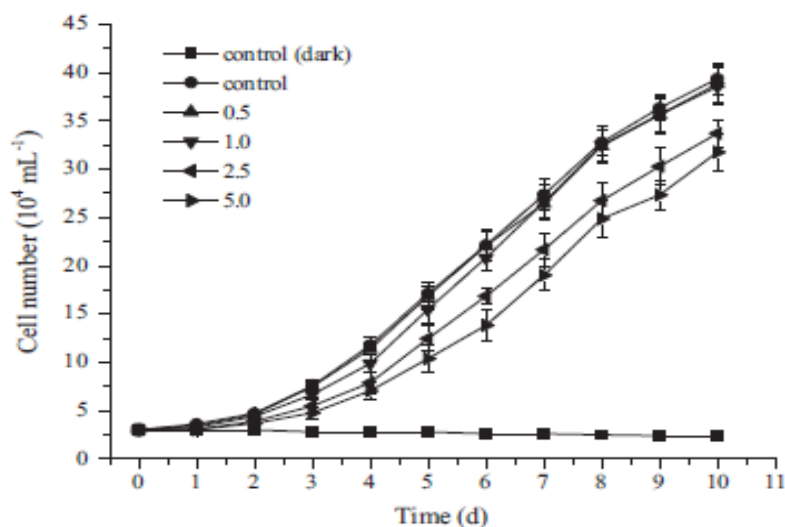
Druga istraživanja provedena na različitim vrstama roda *Euglena*, pokazuju da stanice mijenjaju oblik kao odgovor na povećanje koncentracija polutanata te povećanjem kemijskog ili fizičkog stresora (Azizullah i sur., 2011; Conforti 1998; Mikolajczyk i Diehn 1978; Murray 1981; Takenaka i sur., 1997). Nadalje, istraživanja provedena na vrsti *Euglena gracilis* (G.A. Klebs, 1883) su uključivala dvije različite vrste pesticida: karbofuran (pesticid širokog spektra, insekticid, namatocid i akaricid) i malation (ne-sistematični insekticid) kojima se želio ispitati utjecaj pesticida na vrstu. *E. gracilis* je nakon uzgoja u mediju tretirana različitim koncentracijama doza (0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 21, 34, i 50 mg L<sup>-1</sup>) karbofurana i malationa. Nakon 7 dana promatrali su se učinci pesticida na nekoliko parametar.





**Slika 4.** Stopa rasta kulture *E. gracilis* 7 dana nakon tretiranja: a) karbofuranom i b) malationom. Stupci predstavljaju srednju vrijednost sa standardnom devijacijom (preuzeto iz Azilullah i sur. 2011).

Inhibicijski efekti pesticida pokazali su se jačima kod kratkotrajnog negoli kod dugotrajnog izlaganja vrste pesticidima (Azilullah i sur. 2011). Stopa rasta vrste značajnije je opala kod koncentracije karbofurana od 50 mg L<sup>-1</sup> (Slika 4.a), dok prisutnost malationa pri svim ispitivanim koncentracijama nije utjecao na rast populacije (Slika 4.b). Rezultati dugoročnog izlaganja vrste pesticidima su pokazali da navedeni pesticidi negativno utječu na oblik stanice, brzinu kretanja, pokretljivost, orijentaciju vrste te proces fotosinteze. Drugo istraživanje uključivalo je ispitivanje ekotoksikološkog utjecaja grafenovog oksida (GO) na vrstu *E. gracilis*. U medij u kojem su se uzgajale kulture stanica disperzivno je dodan GO u koncentracijama u rasponu koncentracija od 0.5 do 5 mg L<sup>-1</sup> kroz period od 10 dana. Nakon izlaganja vrste GO-u, stopa rasta i biokemijski odgovor značajno su opadali već nakon drugog dana tretmana. Najveći pad rasta populacije u odnosu na kontrolu bio je pri maksimalnoj koncentraciji od 5 mg L<sup>-1</sup> (Slika 5.).



**Slika 5.** Krivulja populacijske dinamike *E. gracilis* (preuzeto iz Hu i sur., 2015).

Broj stanica nakon 10 dana bio je između  $3.4 \times 10^5$  i  $3.2 \times 10^5$  m L<sup>-1</sup>, dok je broj stanica u kontroli bio  $3.9 \times 10^5$  m L<sup>-1</sup> što je značajan pad ( $P < 0.01$ ) (Hu i sur., 2015). Rezultati istraživanja dokazali su toksični efekt GO na vrstu pri dozi od 2.5 mg L<sup>-1</sup>, na način da se inhibira rasta stanica.

Istraživanja utjecaja hlapljivih aromatskim ugljikovodicima, odnosno BTEX-a (akronim za benzen, toluen, etilbenzen, ksilen) na vrstu *E. gracilis* proučavala su eventualni toksični efekti svakog pojedinačnog spoja, ali i njihove kombinacije. Dobiveni rezultati dokazuju da smjesa BTEX ali i pojedinačni spojevi djeluje toksično na vrstu pri čemu dolazi do morfoloških promjena stanice i smanjenja sadržaja klorofila. Stanice su tretirane BTEX spojem raspona koncentracija od 0.005–5 μM, pri čemu je primijećeno da manje koncentracije mogu inducirati rast populacije te da se stanice mogu oporaviti unutar 48 – 72 sata. Kod koncentracija od 5 μM ili više dolazi do opadanja rasta populacije i nakon tih koncentracija stanice se više nisu u stanju oporaviti te dolazi do gubitka boje, odnosno kloroplasta. Tretiranje stanica visokim koncentracija (3 μM i 5 μM) uzrokuje 95 % smrti stanica nakon 24 sata, također su zabilježene granulirane i abnormalne stanice, promijenjena oblika i boje. (Peng i sur., 2015).

#### 1.4. Utjecaj pesticida na populacije praživotinja u prirodi

Istraživanje koje su proveli Ekelund i sur. (1994) uključivalo je utjecaj triju pesticida; dimetoata, pirimikarba i fenpropimorfa na aktivnost triju glavnih skupina praživotinja u tlu; bičaća (*Cercomonas* sp.), ameba (*Acanthamoeba* sp.) i trepetljikaša (*Colpoda* sp.).

Koncentracije svih pesticida kojima su se tretirale navedene skupine praživotinja iznosile su 934, 500 i 248 mg L<sup>-1</sup>. Ispitivanje utjecaja pesticida u tlu pokazalo je da prisutnost pirimikarba nema značajnog utjecaja na respiraciju u tlu neovisno o dozi, dok su dimetoat i fenpropimorf imali snažan negativan utjecaj na respiraciju u tlu. Rast populacija triju protozoa snažno opada povećanjem koncentracija dimetoata i fenpropimorfa, dok je pirimikarb imao slab učinak na pad populacija i pri većim koncentracijama.

### 1.5. Laboratorijska istraživanja utjecaja pesticida na praživotinje

*Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 jedna je od karakterističnih modelnih organizama u ekotoksikološkim istraživanjima. Kod ove vrste ispitivano je djelovanje nekoliko različitih vrsta pesticida i njihovo toksično djelovanje. Tretiranje papučica pesticidnim sredstvom monokromotofos u koncentracijama od 1 i 10 ppm nema negativno djelovanje na populaciju vrste u prvih 24 h izloženosti, ali pri izloženosti dužom od 24 h dolazi do značajnog smanjenja gustoće populacije pri svim ispitivanim koncentracijama (Rao i sur., 2007). Zapaženo je smanjenje duljine papučice pri koncentracijama višim od 1 ppm u razdoblju izlaganja od 48 do 120 h, dok smanjenje širine i dužine citofarinksa ovisi o testnoj koncentraciji pesticida. Sukladno tome, stopa hranjenja smanjuje se ovisno o dozi. Drugo istraživanje provedeno na ovom trepetljikašu uključivalo je tretiranje s pesticidom cipermetrinom i njegov utjecaj na rast populacije (Dutta, 2015). Tretiranje vrste koncentracijama pesticida od 0.1, 0.15 i 0.2 µg L<sup>-1</sup> pokazalo je trend rasta populacije pri najmanjoj koncentraciji, međutim s povećanjem koncentracija pesticida i s povećanjem vremenskog intervala (od 48h do 96h) dovodi do pada stope rasta i brojnosti populacije same vrste, što nedvojbeno dokazuje toksični učinak pesticida na ispitivani organizam.

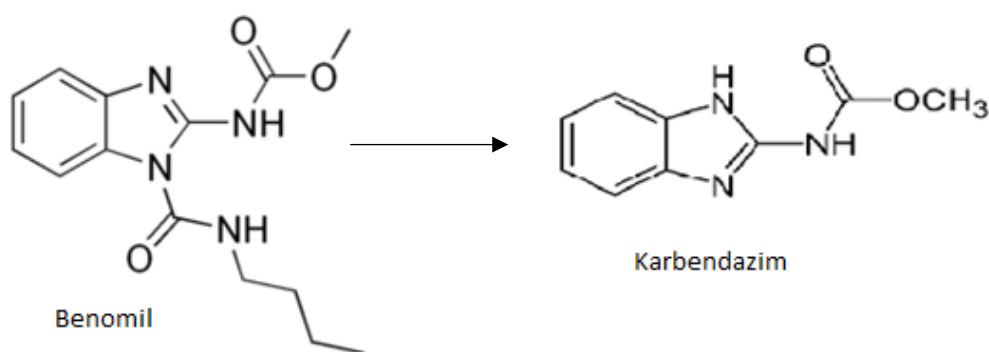
Istraživanja provedena na amebi uključivala su 8 različitih vrsta pesticida (cipermetrin, karbendazim, malation i dr.), koji mogu imati akaricidno, fungicidno ili herbicidno djelovanje (Hikal i sur., 2015). Ameba je pojedinačno tretirana sa svih 8 pesticida sa slijedećim koncentracijama: 0.001, 0.004, 0.007, 0.01, 0.1 i 1 mg L<sup>-1</sup>. Vremenski raspon izloženosti vrste pesticidima iznosio je 1, 10, 24, 48 i 72 h. S obzirom na stupanj inhibicije određenog pesticida, pokazalo se da značajan utjecaj ima dimetoat (79.66 %) kojega redom prate karbendazim, dikuran, butaklor, metomil, malation, fenitrotion dok je najmanji postotak inhibicije pokazivao cipermetrin (68.31 %).

Drugo istraživanje utjecaja 39 različitih pesticida na trepetljikašu *Colpidium campylum* (Stokes, 1886) Bresslau, 1922 je pokazalo da većina pesticida nema vidljivi

toksični učinak do 10 ppm koncentracije. S obzirom na kemijsku strukturu, vidljivo je da su organofosfatni spojevi su generalno toksičniji od organoklornih pesticida. *C. campyllum* se pokazao najosjetljivijim na prisutnost fungicida, dok se herbicidi nisu pokazali visoko toksični za ovu vrstu (Dive i sur., 1980).

### 1.6. Karbendazim

Karbendazim je sintetički fungicid na osnovi benzimidazola i derivat je benomila. Koristi se u industriji papira, kože te tekstila, za čuvanje boja i zaštiti poljoprivrednih kultura (Selmanoglu i sur., 2001). U Australiji se koristi na plantažama makadamija i zabranjen je u industriji tekstila, dok je u SAD-u zabranjen samo u hrani. Karbendazim uzrokuje sterilnost i uništava testise kod životinja te predstavlja rizik za čovjeka ukoliko se unosi oralno u većim dozama (Sakr i Shalaby, 2012; WHO, 1996). Europski parlament je 2009. odobrio korištenje karbendazima kao biocidno sredstvo.



**Slika 6.** Prikaz transformacije molekule benomila u karbendazim (preuzeto i prilagođeno sa <http://ic-agrochem.com/1-3-carbendazim/176474>).

Dolazi u obliku bijelog praha bez mirisa, a može nastati i transformacijom roditeljske molekule benomila (Slika 6.) i najčešće je upotrebljavan benzimidazolni fungicid. Osim kristaličnog praha može biti vodena disperzija, prah topiv u vodi ili može biti u obliku granula (WHO, 1993a). Vrijeme poluraspada karbendazima u okolišu je 6 -12 mjeseci na siromašnom tlu, 3 – 6 mjeseci na tresetu te 2 – 5 mjeseci u vodenom mediju ( pri aerobnim i anaerobnim uvjetima) (Mazellier i sur., 2002; Vega i sur., 2005). Razgradnja karbendazima odvija se najviše od strane mikroorganizama, a glavni produkt je 2 – aminobenzimidazol koji se dalje razgrađuje pod utjecajem mikrobne aktivnosti. Istraživanja su pokazala kako se karbendazim zadržava u površinskim slojevima zemlje, međutim nije dovoljno poznata njegova daljnja apsorpcija u zemlji iako se pretpostavlja da se jednako snažno apsorbira u zemlju kao i benomil. U vodenom mediju karbendazim se jako apsorbira za sediment (WHO, 1993a).

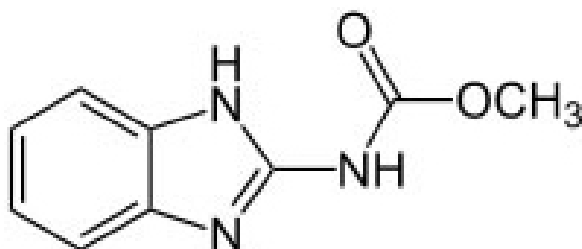
Budući da je stabilan i postojan i do nekoliko tjedana nakon primjene, biljni dijelovi na koje je nanoseno ovo sredstvo apsorbiraju djelatnu tvar, nakon čega se dislocira nepromijenjena ili u obliku metabolita na veće ili manje udaljenosti unutar biljke. Karbendazim može biti dostupan organizmima koji se hrane lišćem ili drugim dijelovima biljke. Zemlja i sediment mogu sadržavati karbendazim i do 3 godine, međutim jaka apsorpcija karbendazima u zemlju i sediment mogu reducirati njegovu izloženost kopnenim i vodenim organizmima.

Primarna izloženost ljudskoj populaciji posljedica je ostataka karbendazima u usjevima. Analiza izloženosti pesticidima u prehrani, provedena u Nizozemskoj i SAD-u, procjenjuje da čovjek unosi jednu desetinu prihvatljivog dnevnog unosa (PDU) koji za karbendazim iznosi  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase.

U životinjskom organizmu, karbendazim se metabolizira u (5 – hidroksi – 1H – benzimidazol -2 -y1) – karbamat i druge polarne metabolite koji se vrlo brzo izlučuju. Dosada nije opažena njegova bioakumulacija u niti jednom biološkom sustavu.

### 1.6.1. Kemijska struktura

IUPAC-ovo ime za karbendazim je metil benzimidazol – 2 – karbamat dok se u komercijalne svrhe koriste i druga imena, poput: Delsene, Konker, Cekudazim, Derosal, Aimcozin, Kombat. Pod ovim imenima ne mora isključivo biti samo karbendazim, već se mogu javiti i primjese drugih pesticida. Karbendazim se dobiva industrijskim postupkom, reakcijom o – fenilenediamina sa metoksikarbonilcijanamidom ili metoksikarbonil izocijanid dikloridom (dobivenim iz cijanogen klorida, fosgena i metanola) u prisutnosti baze (Muller, 2011). Budući da se dobiva sintetski njegova čistoća je veća od 98 %, dok preostala 2 % čine nečistoće (WHO, 1993a).



**Slika 7.** Kemijska struktura karbendazima (preuzeto sa: <https://www.chemservice.com/carbendazim-n-11404-100mg.html>).

Karbendazim je spoj koji se sastoji od benzenova prstena spojena sa jednim prstenom imidazola (sadrži 2 atoma dušika, 4 atoma ugljika te dvije dvostruke veze), na kojemu je vezana karbamatna skupina (Slika 7.).

**Tablica 1.** Identifikacija i svojstva karbendazima

Svojstva spoja		
<b>Naziv spoja</b>	Karbendazim	
<b>IUPAC ime</b>	metil benzimidazol – 2 – karbamat	
<b>Empirijska formula</b>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Identifikacijski broj (CAS)</b>	10605 – 21 - 7	
<b>Fizikalna i kemijska svojstva</b>		
<b>Molekularna masa</b>	191.21 g mol <sup>-1</sup>	
<b>Vrelište (°C)</b>	Nema ga (raspadne se prije)	
<b>Talište (°C)</b>	250	
<b>Log Kow</b>	1.52	
<b>Gustoća</b>	0.27 g cm <sup>-3</sup>	
<b>Topljivost (voda, 20°C) (mg L<sup>-1</sup>)</b>	pH 4	28 mg L <sup>-1</sup>
	pH 7	8 mg L <sup>-1</sup>
	pH8	7 mg L <sup>-1</sup>
<b>Topljivost (organska otapala)</b>	Benzen	36 mg L <sup>-1</sup>
	Etanol	300 mg L <sup>-1</sup>
	Aceton	300 mg L <sup>-1</sup>
	Kloroform	100 mg L <sup>-1</sup>

Prva istraživanja metabolizma karbendazima provedena su na različitim vrstama životinja (miševima, štakorima, zečevima, psima, ovcama i kravama). Životinjama se davala dnevna doza od 0.1 g benomila kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, putem katetera ili oralnim putem. Glavni put metabolizacije je cijepanje sporednog lanca spoja 1 – butilkarbamoil pri čemu nastaje karbendazim. Proces detoksifikacije se odvija putem hidroksilacije i hidrolize i nastaje glavni metabolit metil – 5 – hidroksibenzimidazol – 2 – ilkarbammat (5 – HBC). Nastali metaboliti vrlo brzo se izlučuju u obliku sulfata i glukuronida (Douch, 1973, Gardiner i sur. 1974).

Glavni metabolit karbendazima je 5-hidroksi karbendazim (5-HBC-S). Hidroksilacija se također može pojaviti u 6- ili 5-položaju i može formirati MBC-5,6-diol. Ovaj derivat hidroksida može biti podvrgnut daljnjoj biotransformaciji u glutation ili glukuronid, dok sekundarni dušik iz prstena može formirati N - oksid derivate. Otprilike 98 % karbendazima i njegovih metabolita izlučuje se iz organizma unutar tri dana. Akumulacija karbendazima u tkivu je niska i iznosi manje od 1 %.

### 1.6.2. Primjena i količine u okolišu

Karbendazim se prvenstveno koristi kao fungicid i učinkovito djeluje na široki raspon gljivica, uključujući koljena Ascomycota (mješinarke), Deuteromycota i brojne Basidiomycetes, koje kod biljaka mogu uzrokovati: pjegavost i mrlje na lišću, pjege ili truljenje voća, pojavu plijesni, kraste, truljenje lukovice, propadanje cvijeta i korijena. Najčešće se primjenjuje za zaštitu kultura žitarica, pamuka, grožđa, banana, soje, duhana, povrća i drugih kultura u različitim klimatskim područjima diljem svijeta. Limitirajući faktor uporabe karbendazima i ostalih benzimidazola je razvoj rezistencije kod gljivica. Kako ne bi došlo do otpornosti gljivica, karbendazim se često miješa sa drugim ne – benzimidazolnim fungicidima (Delp, 1980; Staub i Sozzi, 1984).

Registirana uporaba karbendazima ima definiran raspon od 0.2 do 2.0 kg a.s. ha<sup>-1</sup> i može se primjenjivati jednom godišnje u intervalima od 7 – 14 dana (WHO/FAO, 1985a; 1988b). Svjetska prodaja benomila 1991. godine procijenjena je na 290 milijuna američkih dolara, što je oko 50 % svjetskog tržišta benimidazola. Karbendazim i tiofanatemetil zauzimaju dodatnih 40 % (County NatWest Woodmac, 1992). U Velikoj Britaniji ukupna količina karbendazima korištena za tretiranje usjeva 1999. godine iznosila je čak 337.716 kg, dok je 2015. godine količina korištenog karbendazima iznosila 40.215 kg (FERA).

### 1.6.3. Toksikologija

Toksikološka baza podataka o karbendazimu je neujednačena u svojoj pokrivenosti i kvaliteti. Osim akutnih i genotoksičnih istraživanja, mnogi eksperimenti datiraju iz ranih 1970-ih i nisu u skladu s trenutnim testnim smjericama ili standardima izvješćivanja. Međutim, postoje opsežniji i noviji podaci o reproduktivnoj i razvojnoj toksičnosti. Akutna istraživanja toksičnosti dostupna su samo za jednu vrstu karbendazima formulacije 50 % SC (Shincar 500 SC fungicid). Istraživanja provedena na laboratorijskim životinjama dokazala su reproduktivne, razvojne, mutagene i karcinogene učinke inducirane karbendazimom. Sva genotoksična istraživanja provedena kod životinja pokazuju brojne kromosomske aberacije, koje su u skladu sa dokazanim utjecajem karbendazima na mikrotubule.

**Tablica 2.** Učinak karbendazima na ljude i životinje (EFSA)

<b>Postotak apsorpcije</b>	Gotovo potpuna apsorpcija – 86 % kod štakora
<b>Distribucija</b>	Kod štakora, nakon oralne primjene najvećih koncentracija, ostaci benomila/karbendazima pronađeni su u očima, krvi, jetri i bubregu
<b>Akumulacijski potencijal</b>	Nema dokaza da se akumulira
<b>Postotak ekskrecije</b>	Kod štakora, 72h nakon oralne primijene 86 % se izlučilo putem urina, a 13 % putem fecesa
<b>Metabolizam</b>	Glavni metabolit je 5 – hidroksi karbendazim (5 – HBC – S)
<b>Genotoksičnost</b>	Genotoksičnost se javlja nakon prekoračenja sigurnosne razine. Karbendazim inducira razne kromosomske aberacije ometajući formaciju diobenog vretena.
<b>Kancerogenost</b>	Inducira proliferaciju jetrenih stanica kod miševa što dovodi do razvoja hepatocelularnih adenoma. Ne smatra se prikladnim modelom za formaciju jetrenih tumora kod ljudi. Nema dokaza da djeluje zajedno sa DNA u provedenim genotoksičnim istraživanjima.
<b>Imunotoksičnost</b>	Nema podataka
<b>LD50 (mg/kg tm) (Štakor/oralno)</b>	>2000
<b>Iritacija očiju/kože</b>	Ne izaziva iritaciju kod zečeva
<b>Preporučene vrijednosti za pitku vodu</b>	0.09 mg L <sup>-1</sup>

Istraživanja provedena na štakorima pokazala su kako se u metabolizmu benomil lako pretvara u karbendazim (Slika 7.), gdje se oko 70 % primijenjenog benomil pretvara u karbendazim u roku od jednog sata (Sherman i sur. 1975). Nakon oralne izloženosti karbendazim se lako apsorbira, nakon čega se intenzivno metabolizira i izlučuje putem urina i fecesa. Nadalje, kod štakora su primijećeni teratogeni učinci inducirani karbendazimom (glava i oči) nakon što su hranjenjem preko sonde bili izloženi dozama karbendazima od 30 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup> (NOEL 10 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup>), međutim izloženost dozama većim od 700 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup> putem hrane nije uzrokovalo ozbiljnu razvojnu i/ili reproduktivnu toksičnost. Sličan efekt primijećen je i kod benomila. Pretpostavlja se kako doziranje karbendazima putem sonde dovodi do zasićenja metaboličkih puteva zbog čega visoke koncentracije karbendazima prolaze kroz posteljicu i utječu na razvoj fetusa. Također je potvrđeno i toksično djelovanje karbendazima na testise štakora. U provedenim istraživanjima, jedna doza od 50 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup> bila je dovoljna da izazove ili povećanje frekvencije mikronukleusa u spermatidima ili prerano oslobađanje zametnih stanica dva dana nakon izlaganja karbendazimu, atrofija sjemenskih kanala, smanjen promjera sjemenih kanala te abnormalni rast kanala testisa.



Navedeni učinci traju najmanje 70 dana nakon izlaganja. Iz raspoloživih istraživanja nema NOEL vrijednosti za toksičnost testisa.

Pokusi na miševima dokazali su toksičan učinak karbendazima na jetru životinja. Sve životinje imale su degenerativne promjene jetre; nekrozu stanica, mitotičke stanice, pigmentirane Kupffer stanica, centrilobularna hipertrofija. Kod miševa i štakora dolazi do reproduktivne toksičnosti inducirane karbendazimom pri jednokratnom ali i dugoročnom izlaganju (Lu i sur., 2004). Karbendazim djeluje teratogeno i embriotoksično što za posljedicu ima veću stopu smrtnosti embrija, malformacije skeleta, razvoj deformiranih fetusa te smanjenu fertilitnost (Gray i sur. 1990; Sitarek, 2001; Minta i sur., 2004; Farag i sur., 2011).

Dugoročna istraživanja gdje se psima preko hrane davao karbendazim, dovela su do hepatotoksičnosti što je potvrdila i povećana aktivnost ALP te povećanje jetre kada je koncentracija u hrani bila veća od 5000 ppm (Reuzel i sur., 1976). Ovaj rezultat je potkrijepljen sličnim nalazima u istraživanjima učinka benomila u pasmine bigla gdje su također zabilježeni povišeni enzimi jetre i njena težina kada je u hrani koncentracija benomila iznosila 2500 ppm.

Prihvatljiv dnevni unos (ADI - acceptable daily intake) za karbendazim iznosi  $0.03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ tm d}^{-1}$ , na temelju NOEL vrijednosti od  $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ tm d}^{-1}$  dobivene istraživanjem na psima i uz primjenu sigurnosnog faktora 100.

Akutna referentna doza (ARfD - Acute reference dose) karbendazima iznosi  $0.05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ tm}$  i dobivena je primjenjivanjem sigurnosnog faktora 1000 na LOEL vrijednost od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , koja je dobivena nakon istraživanja testikularne toksičnosti na štakorima.

Preporučena vrijednost karbendazima u pitkoj vodi ne bi smjela prelaziti  $0.09 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Tablica 3.** Vrijednosti ADI, ARfD i NOEL

	<b>NOEL</b> ( <b>mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup></b> )	<b>Istraživanja</b>	<b>Sigurnosni faktor</b>
<b>ADI</b> ( <b>0.03 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup></b> ) <b>Kronični hepatitis</b>	<b>2.5</b>	Dugoročno tretiranje pasa putem prehrane	100
<b>ARfD</b> ( <b>0.05 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup></b> ) <b>Toksičnost testisa</b>	<b>50 (LOEL)</b>	Testikularna toksičnost kod štakora	1000
<b>NOEL</b> ( <b>5 mg kg<sup>-1</sup> tm d<sup>-1</sup></b> ) <b>Toksičnost testisa</b>	<b>50 (LOEL)</b>	Reproduktivna toksičnost kod štakora	10

Poznato je da karbendazim djeluje toksično na diobeno vreteno i da može inducirati brojne kromosomske aberacije nakon mitotičke, ali i mejotičke diobe stanica (Singh, 2016). Smatra se kako do opisanog aneugeničkog mehanizma može doći kod koncentracija karbendazima koje su iznad propisanog sigurnosnog praga, pri čemu može uzrokovati teratogenost i toksičnost testisa, kao i njegov roditeljski spoj – benomil. Kancerogeno djelovanje karbendazima nije dokazano. Čovjek može biti izložen karbendazimu direktnim putem (oralno, inhalacijom ili dermalno) ili indirektno (putem prehrane, kontaminiranom vodom ili izlaganjem na poslu). Neka od istraživanja provedena u SAD-u i Nizozemskoj pokazala su kako se u Nizozemskoj unese koncentracija od  $0.83 \mu\text{g kg}^{-1}\text{dan}^{-1}$  ( $0.05 \text{ mg dan}^{-1}$  osobi<sup>-1</sup>) te u SAD-u  $0.144 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ . Unesene koncentracije karbendazima putem prehrane daleko su ispod PDU koji za karbendazim iznosi 0.01 mg/kg tjelesne mase. Zabilježeno je da karbendazim inhibira proliferaciju mureina (Hammond i sur., 2001) i proliferaciju stanica raka dojke (MCF7) tako što inducira abnormalnosti diobenog vretena, zastoj metafaze te suzbijanjem dinamičke nestabilnosti tubulina (Yenjerla i sur., 2009). Karbendazim smanjuje vijabilnost, mijenja ekspresiju gena i inducira apoptozu u trofoblastu (nenasljednom mutagenu) (Adedara i sur., 2013; Kosasa i sur., 1999) koji pokazuje jako aneugeno djelovanje na ljudske limfocite (Bentley i sur., 2000).

Istraživanje provedeno na nacionalnoj razini u Australiji između 1999. i 2000. godine, pod pokroviteljstvom DAFF (Australian Government Department of Agriculture Fisheries and Forestry), pratilo je ostatke benomila u makadamijima, jabukama i kruškama (definicija ostatka benomila uključuje i prisutnost karbendazima). Iako ostaci nisu pronađeni u makadamijima (zabilježe granice = 0,1 mg kg), 145 od 317 analiziranih uzoraka su sadržavali ostatke benomila u jabukama i kruškama. Međutim, niti jedan uzorak nije sadržavao ostatke veće od maksimalno dozvoljenih razina od  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Budući da karbendazim djeluje embriotoksično, teratogeno, sterilnost i uzrokuje apoptozu zametnih stanica kod različitih vrsta sisavaca (Mantovani i sur., 1998; Rama i sur., 2014) na način da izravno djeluje na mikrotubule, stanične strukture ključne u formiranju diobenog vretena prilikom profaze stanične diobe. Karbendazim inhibira polimerizaciju mikrotubula u stanicama gljiva i sisavcima djelujući s  $\beta$ -tubulinom koji uzrokuje poremećaj strukture mikrotubula, što dovodi do oštećene kromosoma tijekom podjele stanica (Yanjerla i sur., 2009; Rama i sur., 2014). Razlog slabije otrovnosti kod sisavaca je njegova selektivna toksičnost, što se može objasniti načinom na koji se veže na tubulin kod različitih vrsta (WHO, 1993).

Proces industrijske proizvodnje i opsežne uporabe u agronomiji olakšava ulazak karbendazima u vodene ekosustave. Izmjerene koncentracije karbendazima u takvom okolišu iznose  $4.5 \text{ mg L}^{-1}$  (Chatupote i Panapitukkul, 2005; Silva i sur., 2016). Štetni učinci karbendazima potvrđeni su i za vrstu *Eisenia fetida*, gdje toksično djeluje na biokemijske parametre, embrionalni razvoj i ekspresiju gena (Rico i sur., 2016; Huan i sur., 2016). Toksičnom djelovanju karbendazima izložena su i jaja šarana (*Carassius gibelio*) u dozi od  $0.036 \text{ mg L}^{-1}$  (Ludwikowska i sur., 2013). Istraživanja dugoročnih ekoloških posljedica karbendazima na vodenim životinjama još uvijek su u začetku.

Karbendazim također ima toksično djelovanje i na ptice, pri čemu utječe na njihov reproduktivni sustav (Aire, 2005). Toksičnost za ptice je relativno niska sa akutnom dozom od  $\text{LD}_{50} > 2250 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase (Europska komisija, 2007).

Istraživanja na pčelama pokazala su netoksično djelovanje karbendazima na pčele (WHO, 1993b).

Karbendazim ima snažno inhibicijsko djelovanje kod vrste *Aspergillus sp.*, dok njegovo inhibicijsko djelovanje na aktivnost nitrifikacije vrsta *Nitrosomonas sp.* i *Nitrobacter agilis* nije zabilježena. Suspenzija kultura imala je vrijednosti  $100 \text{ mg L}^{-1}$  karbendazima za organizme koji se nalaze u mulju, kao što je *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, karbendazim negativno utječe tek iznad vrijednosti od  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (INCHEM).

Toksičnost karbendazima kod zelenih algi ovisi o vrsti, s vrijednostima  $\text{EC}_{50}$  u rasponu od  $0,34 \text{ mg L}^{-1}$  za vrstu *Chlorella pyrenoidosa* do  $419 \text{ mg L}^{-1}$  za vrstu *Scenedesmus subspicatus*. Karbendazim djeluje kao algicid na vrsti *Raphidocellis subcapitata*, s  $\text{EC}_{50}$  od  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  i NOEC vrijednosti od  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  (Daam i sur., 2010; INCHEM).

Karbendazim ima izrazito veliku toksičnost kod riba, vodenih beskralješnjaka i škampa, gdje se vrijednost  $LC_{50}$  kreće od  $0.007 \text{ mg L}^{-1}$  za ribe do  $0.087 \text{ mg L}^{-1}$  za vodene beskralješnjake te  $0.098 \text{ mg L}^{-1}$  za škampe (IPCS INCHEM).

**Tablica 4.** Toksične doze za različite skupine organizama (Europska komisija, 2007).

<b>Kopneni kralježnjaci</b>		
<b>Akutna toksičnost kod sisavaca</b>	$LD_{50} > 5000 \text{ mg kg}^{-1}$ (pas)	
<b>Reproduktivna toksičnost kod sisavaca</b>	NOEL $22.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$	
<b>Akutna toksičnost kod ptica</b>	$LD_{50} > 2250 \text{ mg kg}^{-1}$ (bjeloglava prepelica)	
<b>Reproduktivna toksičnost kod ptica</b>	NOEL $322 \text{ ppm}$ benomila (ekvivalentno $212 \text{ ppm}$ karbendazima = $26.4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ tm d}^{-1}$ (divlja patka)	
<b>Vodeni organizmi</b>	Vrsta	Toksičnost ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Akutna toksičnost kod riba</b>	<i>Cyprinus carpio</i>	$0.44 LC_{50}$
<b>Akutna toksičnost kod beskralješnjaka</b>	<i>D. magna</i>	$0.15 EC_{50}$
<b>Akutna toksičnost kod algi</b>	<i>S. subspicatus</i>	$> 8.0 EC_{50}$
<b>Kukci</b>		
<b>Akutna (oralna) toksičnost kod pčela</b>	$LD_{50} > 756 \mu\text{g pčela}^{-1}$ (48h)	
<b>Gujavice</b>		
<b>Akutna toksičnost</b>	$LC_{50} 5.4 \text{ mg a.t. kg}^{-1}$ (14 d) $3.9 \text{ mg a.t. kg}^{-1}$ (28 d)	
<b>Reproduktivna toksičnost</b>	NOEC $1.0 \text{ mg a.t. kg}^{-1}$	

Toksičnost karbendazima varira ovisno o mediju u kojemu se nalazi (voda, zemlja ili sediment). U zemlji najvjerojatnije se veže za mineralne čestice preko imidazolnog prstena. Adsorpcija je jako izražena zbog čega ne prodire u dublje slojeve zemlje, unatoč niskoj vrijednosti  $\log K_{ow}$ . Kontaminacija podzemnih voda od strane karbendazima se ne očekuje, što je potvrđeno monitoringom voda iz bunara. Manji udio raspadanja karbendazima u prirodi je abiotskog porijekla dok se veći udio raspadanja događa pod utjecajem mikroorganizama i predatornih bakterija pri čemu se raspada na 2 – aminobenzimidazol i podložan je daljnjoj degradaciji. Umjerena bioakumulacija karbendazima zabilježena je u laboratorijskim istraživanjima pri konstantnim koncentracijama dok se značajnija bioakumulacija ne očekuje i u prirodi.

Mikroflora tla može izravno ili posredno biti izložena letalnim dozama karbendazima. Mnoga istraživanja ukazuju na negativan utjecaj zaostajanja karbendazima na mikrobiološki sastav zajednice tla, mikrobiološku brojnost i funkcije ekosustava posredovane mikroorganizmima (Yunlong i sur., 2009; Wang i sur., 2009, 2016). Daljnja istraživanja pokazala su negativan utjecaj karbendazima na nitrificirajuće i denitrificirajuće populacije bakterija u tlu (Fawole i sur. 2010).

#### Izlučivanje karbendazima iz životinjskog organizma:

Pokusi na štakorima kojima je putem sonde unesen radioaktivni [<sup>14</sup>C] karbendazim u dozama od 2 mg kg<sup>-1</sup> kroz period od 10 dana, pokazuju da se 59 % radioaktivnosti eliminira putem urina te 36 % putem fecesa. Proces ekskrecije najbrže se odvijao prva tri dana. Ostaci karbendazim u jetri iznosili su 0.03 % od primjenjene doze nakon 7 dana te 0.08 % nakon 14 dana. 7 dana nakon tretiranja razine karbendazima u krvi i ostalim organima (bubrezima, salu, mišićima i gonadama) nisu prelazile 0.03 % primljene doze (Christ i Kellner, 1973). Uspoređivanjem metaboličke transformacije radioaktivno označenog karbendazima kod štakora i miševa pokazalo je veće koncentracije metabolita u urinu miševa nego kod štakora. Primijećeno je da u jetri miševa pri velikim koncentracija/dozama dolazi do zasićenja pri čemu dolazi do smanjenja detoksifikacijskog kapaciteta, dok kod štakora dolazi do povećanja deksifikacijskog kapaciteta koji postaje učinkovitiji i pokazuje veću stopu eliminacije nego što je kod miševa. Slabija sposobnost izlučivanja i eliminacije ostataka karbendazima razlog su razvoja hepatotoksičnosti kod miševa (Dorn i sur., 1983; Tablica 2). Metabolizam preživača (krava i koza) daleko je učinkovitiji u izlučivanju karbendazima putem urina i fecesa (>80 %). Veće koncentracije zadržavanja karbendazima zabilježene su u mlijeku krava i koza, dok su manje koncentracije u tkivu jetre i bubrega. Koncentracije zaostalog karbendazima u salu i mišićima prisutni su samo u tragovima (Gardiner i sur., 1974).

#### **1.6.4. Istraživanja utjecaja karbendazima na prirodnim populacijama praživotinja**

Pretraživanjem različitih baza podataka (Google scholar, PubMed i Scopus) trenutno nema poznatih objavljenih publikacija o potencijalno toksičnom utjecaju karbendazima na vrstu *E. viridis* ili na druge praživotinje koje su temelj hranidbenog lanca.

## 1.7. Cilj istraživanja

*E. viridis* je dobar bioindikatorski organizam i stoga je idealan modelni organizam u toksikološkim studijama (Hu i sur. 2015)., dok je karbendazim jedan od najčešće korištenih pesticida a ujedno se u laboratorijskom eksperimentalnom radu koristi i kao dobro poznata tvar za blokiranje stvaranja diobenog vretena.

Stoga je cilj diplomskog rada istražiti potencijalan toksičan učinak fungicida karbendazima na jednostanične slatkovodne organizme koristeći *E. viridis* kao modelni organizam, simulacijom prirodnih uvjeta u laboratoriju. Također, cilj istraživanja je bio odrediti preživljenje vrste, dinamiku populacije te biokemijske promjene koje se događaju unutar istraživnog organizma nakon izlaganja različitim dozama fungicida karbendazima.

## 2. MATERIJALI I METODE

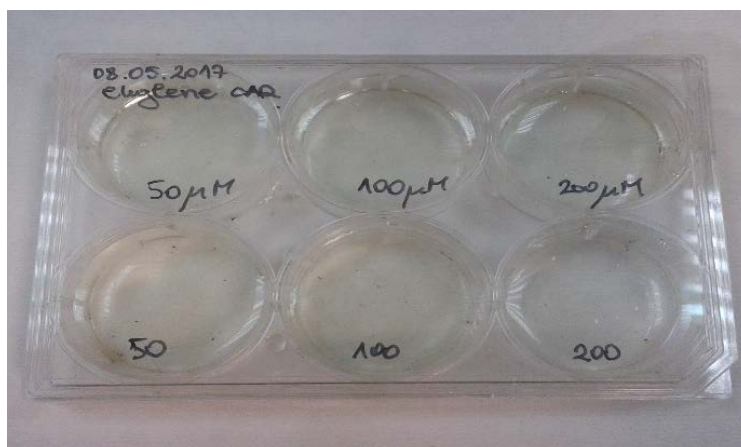
### 2.1. Uspostavljanje starter kulture vrste *Euglena viridis*

Za potrebe pokusa korištena je vrsta *E. viridis*. Čista starter kultura euglena održavana je prema protokolu (Miliša i sur., 2017) uzgoja u kojoj se u autoklaviranim staklenim posudama na dno polaže kompostna zemlja prekrivena debelim slojem kalcijevog karbonata i prelivena destiliranom vodom. Euglene od 10 mL sa ukupnim brojem stanica od  $1 \times 10^6 \text{ m L}^{-1}$  dodane su u opisanu autoklaviranu posudu i posuda je zatvorena kako bi se uspostavila zatvorena zajednica euglena koje zbog mogućnosti fotosinteze uspostavljaju životnu zajednicu bez drugih vodenih mikroorganizama.

### 2.2. Praćenje brojnosti populacije *E. viridis*

Čistu kulturu vrste prethodno uzgojenu u laboratorijskim uvjetima iz prethodno opisane starter kulture uzgojene po protokolima, nasadila sam na pločicu sa 6 jažica u volumenu od 1 mL te sam dodala 9 mL akvarijske vode kako bih postigla što prirodnije uvjete koji prevladavaju u slatkovodnom okolišu. Kako bih odredila populacijsku dinamiku vrste *E. viridis* pratila sam njenu brojnost kroz vremenski period od 14 dana. Stanice sam brojala na Bürker-Türk komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Prije brojanja uzorke sam prethodno pripremila na način da sam pipetirala 10  $\mu\text{L}$  prethodno resuspendiranih stanica i stavljala u epicu od 1 mL zajedno sa 10  $\mu\text{L}$  formalina (puferiran, 4 %-tni) kako bi se euglene fiksirale. Zatim sam odpipetirala 10  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka i brojala na Bürker-Türk komorici.

Osim praćenja kontrolne populacije, pratila sam i dinamiku populacija tretiranih sa tri različite doze karbendazima: 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$ . Čistu kulturu euglena tretirala sam sa 1 mL različitih doza pesticida pripremljenim iz stock otopine na koje sam dodala 9 mL akvarijske vode u svaki od 6 bunarića (Slika 8.). Sve doze su duplicirane kako bi se srednjom vrijednošću dobila što točnija brojnost. Brojnost sam pratila na prethodno opisan način kroz vremenski period od 14 dana.



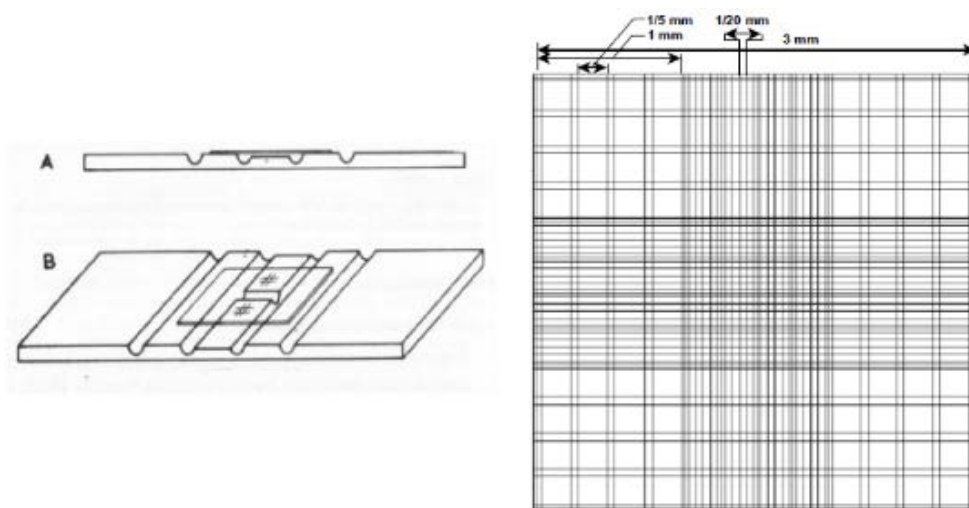
**Slika 8.** Pločica sa uzorcima tertiranim duplikatima koncentracija 50 µM, 100 µM i 200 µM.

Kod brojanja sam gledala sam vanjske dijelove komorice i brojala samo one stanice koje se nalaze unutar kvadrata i na dvije susjedne stranice, u ovom slučaju na gornjoj i lijevoj strani kvadrata. Duljina stranice kvadrata iznosi 1/5 mm, a visina nakon stavljanja pokrovnice iznosi 1/10mm (Slika 9.).

Formula koju sam koristila za određivanje brojnosti euglena u 1mL:

$$N = \frac{\bar{X}}{16} \times \frac{1}{V} \times R(2x) \times 10^3 (mL)$$

N – broj euglena; R- razrjeđenje; V – volumen kvadra;  $\bar{X}$  - srednji broj euglena



**Slika 9.** Shematski prikaz Bürker-Türk pločice korištene za brojanje stanica (preuzeto sa <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>).



### **2.3. Priprava radne otopine karbendazima**

Karbendazim korišten u eksperimentu dobiven je iz tvornice i imao je 99,99 % čistoću. Budući da je izrazito viskozan i teško se otapa u vodi, pesticid sam prije korištenja otopila u 8 mL DMSO-a (dimetil sulfoksida) uz konstantno miješanje staklenim štapićem. Iz 10 mL pripremljene otopine (5 x razrijeđenog pesticida) pipetirala sam u volumenu od 250  $\mu$ L u Falcon eprevetu te sam dodala destilirane vode do 50  $\mu$ L volumena kako bih dobila 1 mM otopinu karbendazim.

### **2.4. Određivanje letalne koncentracije LC<sub>50</sub>**

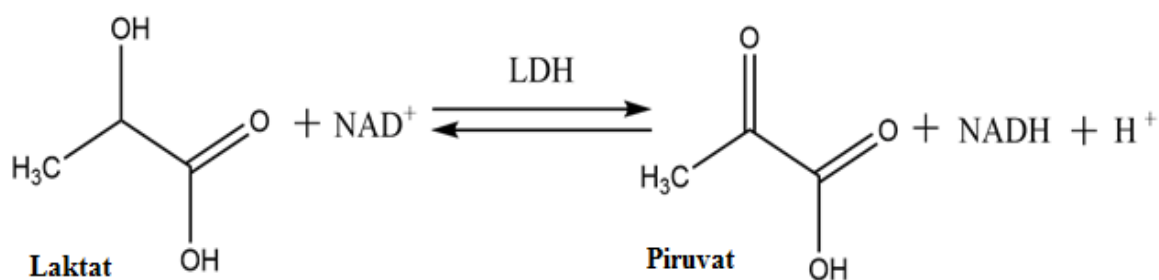
LC<sub>50</sub> označava dozu toksikanta koja je letalna za 50 % organizama neke vrste unutar određenog vremenskog. Kako bih odredila vrijednost LC<sub>50</sub>, euglene sam tretirala različitim dozama karbendazima u rasponu od 0.1 nM do 750  $\mu$ M. Euglene sam brojala prije tretmana karbendazimom i ponovno 24 sata nakon tretiranja stanica karbendazimom. Osim brojnosti gledala sam i druge parametre kao što su: oblik stanice, pokretljivost, smežuranost te udio mrtvih i živih stanica, koje sam deskriptivno opisala. Nakon završetka tretirane euglene sam ispipetirala u Falcon epruvetu volumena 14 mL i centrifugirala pola sata na 15 000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant sam odlila u epice koje sam stavila u hladnjak na -80°C da bi ih kasnije mogla koristiti za biokemijske testove (MTS, LDH i SOD).

### **2.5. Praćenje biokemijskih promjena**

Biokemijske promjene pratila sam prateći razine oksidativnog stresa unutar populacije. U tu svrhu koristila sam LDH, MTS i SOD testove.

#### **2.5.1. Laktat – dehidrogenaza (LDH) test izloženosti *E. viridis* različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti**

Mjerenjem aktivnosti enzima laktat - dehidrogenaze (LDH) određuje se citotoksičnost neke tvari i služi kao pokazatelj integriteta stanične membrane, a budući da je LDH prisutan samo u citoplazmi ne bi smio biti prisutan u staničnom okolišu. Enzim LDH je nespecifični biljeg prisutnosti oštećenja tkiva.

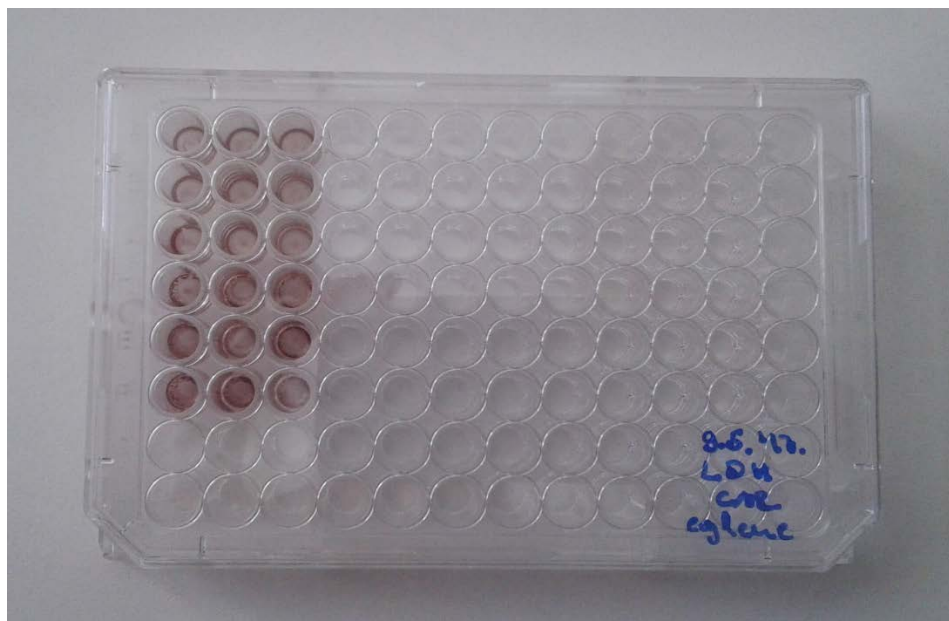


**Slika 10.** Oksidacija laktata u piruvat uz prisutnost LDH, pri čemu se  $\text{NAD}^+$  reducira, a mjeri se porast apsorbancije NADH (slika prilagođena i preuzeta sa [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K1316012](http://parts.igem.org/Part:BBa_K1316012)).

LDH je enzim glikolitičkog puta koji katalizira oksidaciju laktata u piruvat uz posredovanje  $\text{NAD}^+$  kao akceptora vodika (Panteginini M Bais R., 2014) (Slika 10.). Reverzibilnost ove reakcije čini osnovu za mjerenje LDH aktivnosti gdje je stopa proizvodnje NADH spektrofotometrijski određena na 340 nm (Schumann G, i sur., 2002).

Neophodan je u stvaranju energije, a visoka specifična aktivnost zabilježena je u jetri, mišićima, srcu, bubrezima i eritrocitima, premda je prisutan u gotovo svim stanicama tijela. Vrijednosti LDH ne ukazuju na uzrok ili lokaciju povećanja aktivnosti, međutim zajedno s drugim testovima koristan je u procjeni i monitoringu stanja koja dovode do oštećenja tkiva ili razna maligna oboljenja.

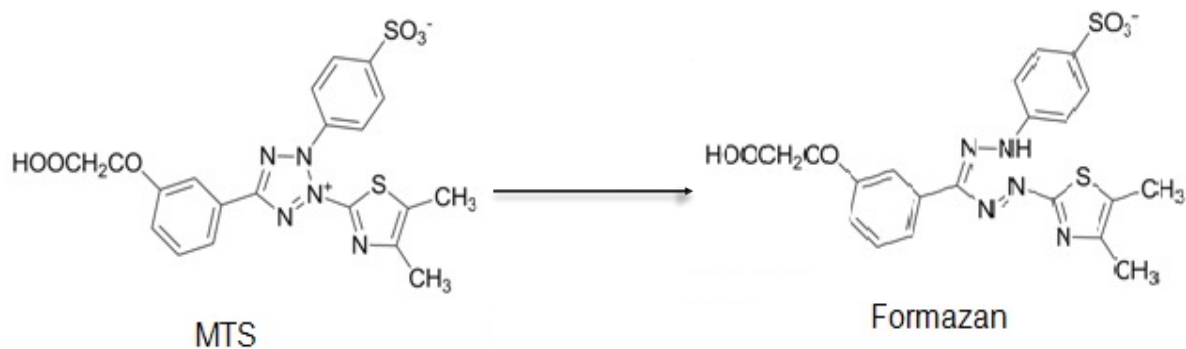
Za određivanje katalitičke aktivnosti enzima LDH (prema protokolu proizvođača Promega) koristila sam (prethodno opisane) uzorke u koje sam dodala 300  $\mu\text{L}$  pufera (50 mM PBS i 0,1 mM EDTA). Nakon dodavanja pufera, uzorke sam homogenizirala ultrazvučnom sondom oko 60 sekundi na 15 000 rpm-a. Nakon homogenizacije, supernatant sam ponovno ispipetirala u nove epruvete. Na pločicu sa 96 bunarića sam stavljala triplikate uzoraka volumena 50  $\mu\text{L}$  i 50  $\mu\text{L}$  reagensa (CytoTox96<sup>®</sup>) (Slika 11.). Prvi triplikat bila je kontrola u koju sam stavila netretirane kulture stanica volumena 100  $\mu\text{L}$ , a zadnji triplikat bila je destilirana voda volumena 100  $\mu\text{L}$ . Pločicu sam zatim zamotala u foliju kako bih je zaštitila od svjetlosti i inkubirala je na sobnoj temperaturi 30-45 minuta na sobnoj temperaturi (25°C). Nakon što su se uzorci inkubirali izmjerila sam apsorbanciju na ELISA čitaču pločica (Bio-Rad Microplatete reader model 550) pri valnoj duljini od 490 nm.



**Slika 11.** Pločica s triplikatima uzoraka različitih koncentracija nakon očitavanja absorbancije.

### **2.5.2. MTS test izloženosti *E. viridis* različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti**

MTS test je kolorimetrijska metoda koja se koristi u citotoksičnim istraživanjima u svrhu određivanja preživljenja stanica. Metoda se provodi uz pomoć kita koji se sastoji od MTS tetrazolijeva sol [[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i PES (eng. phenazine ethosulfate) koji ima sposobnost povećavanja kemijske stabilnosti reagensa i omogućava spajanje sa MTS-om kako bi se dobila stabilna otopina. Metoda se temelji na sposobnosti živih organizama da reduciraju žuto obojeni MTS u ljubičasto obojeni formazanski produkt, djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza uz pomoć NADPH ili NADH (Promega, 2012) (Slika 12.).



**Slika 12.** Reakcija redukcije MTS-a u formazan. (preuzeto i prilagođeno sa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F6/>)

Prednost ovog testa je nastali obojeni produkt koji je topiv u mediju za uzgoj stanica te se rezultat može odmah očitati. Intenzitet boje nastao apsorpcijom se mjeri spektrofotometrijski, a intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica.



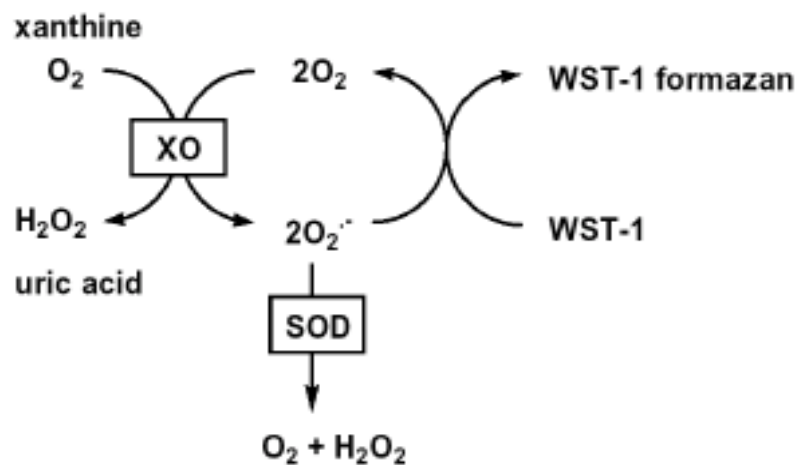
**Slika 13.** Pločica sa 96 jažica s triplikatima uzoraka nakon očitavanja absorbancije.

Kako bih provela MTS test (prema protokolu Promega), na pločicu sa 96 jažica nasadivala sam triplikate uzoraka tretiranih stanica, triplikate kontrole koja je sadržavala netretiranu kulturu stanica te triplikate destilirane vode (Slika 13.). U jažice sam stavljala 100  $\mu\text{L}$  homogeniziranog uzorka (stanice tretirane karbendazimom) i 20  $\mu\text{L}$  reagensa (CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>euos</sub> One Solutin Reagent). Nakon dodatka reagensa, pločicu sam zaštitila aluminijskom folijom i inkubirala oko 30 - 40 minuta na sobnoj temperaturi (25°C). Absorbanciju sam očitala na ELISA čitaču pločica s filtrom valne duljine od 490 nm.

### 2.5.3. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod *E. viridis* pri različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti

Superoksid dismutaza je jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima. SOD katalizira dismutaciju superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ), pri čemu se jedna molekula oksidira u molekularni kisik ( $O_2$ ), a druga reducira u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) (Slika 14.). Jedinica SOD-a definira se kao količina enzima koji je potreban da se dostigne 50 %-tna inhibicija redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Postotak inhibicije računa se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A / \text{min}) / (\Delta A / \text{min}) \times 100$$



**Slika 14.** Reakcija katalize (Preuzeto sa <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.pdf>).

#### Priprava otopina:

Reagens A: Cyt c + Xantin pomiješala sam u omjeru 10:1

- Cyt c 0,05 mM pripremila sam otapanjem 28,97mg citokroma c u 190 mL puferu (50 mM PBS i 0,1 mM EDTA)
- Xantin 1mM pripravila sam otapanjem 3 mg xantina u 19,74 0,1 mM NaOH

Reakcijska smjesa B: XOD (xantin oksidaza) sam pripremila razrijeđenjem 40  $\mu$ L xantinoksidaze dodavanjem 960  $\mu$ L  $H_2O$ .

#### Postupak mjerenje aktivnosti SOD:

Budući da aktivnost enzima xantin oksidaze može varirati, prije svakog pokusa enzim sam baždarila kako bih uskladila koncentraciju enzima kako bi brzina redukcije citokroma C bila

analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez prisutnosti superoksid dismutaze. Slijepa proba je bila kiveta sa 2 mL H<sub>2</sub>O. Kako bih odredila aktivnost superoksid dismutaze u staklenu kivetu sam dodala 35 µL uzorka nakon čega sam dodala 35 µL reakcijske smjese (B) i 1.45 mL reagensa (A). Vrijeme reakcije mjerila sam 3 minute na 550 nm pomoću spektrofotometra.

## **2.6. Priprema uzoraka za fluorescencijsko-mikroskopsku detekciju**

Za dokazivanje slobodnih radikala pomoću fluorescentnog mikroskopa koristila sam dihidrokloroflorescin (H<sub>2</sub>DCF) boju koja reagiranjem sa vodikovim peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) daje zeleno obojenje i dihidroksietidij (DHE) boju koja daje crveno obojenje nakon reakcije sa superoksidnim anionom (O<sup>2-</sup>). Boje sam pripremila na način da sam ih otopila u HEPES mediju pH vrijednosti 7 nakon čega sam pripremila 20 mM otopinu. Konačnu radnu otopinu dobila sam dodavanjem 995 µL 20 mM HEPES medija i 5 µL boje, koju sam potom zamotala aluminijskom folijom budući da su boje osjetljive na svjetlo i držala ih u hladnjaku.

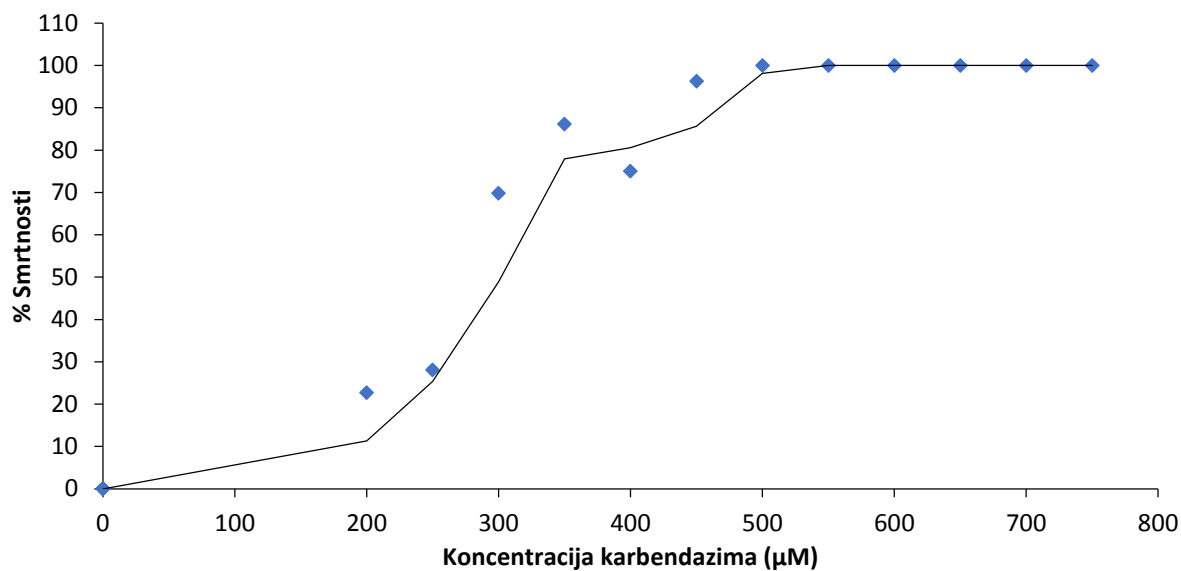
Preparate za fluorescencijski mikroskop sam pripremila miješanjem čiste kulture euglena sa koncentracijama karbendazima od 200 µM i 400 µM u epruvetu ukupnog volumena 1 mL. Stanice su tretirane kroz različiti vremenski period od 8, 10 i 12 sati, nakon čega sam u epruvetu ispipetirala 15 µL otopine doza (200 µM; 400 µM) i 15 µL boje (H<sub>2</sub>DCF/DHE) u omjeru 1:1. Tako pripremljeni uzorak pipetirala sam na predmetno stakalce i pokrila pokrovnim stakalcem i gledala na fluorescencijskom mikroskopu i slikala Olympus kamerom.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Akutno izlaganje populacije *E. viridis* pesticidom karbendazimom, brojnost stanica i LC<sub>50</sub>

**Tablica 5.** Brojnost stanica prije tretiranja karbendazimom i nakon 24 sata u rasponu doza od 0,1 nM do 750 μM.

Koncentracija karbendazima [μM]	Srednja vrijednost Nx10 <sup>5</sup> stanica (T <sub>0</sub> )	Srednja vrijednost Nx10 <sup>5</sup> stanica (T <sub>24h</sub> )	Koncentracija karbendazima [μM]	Srednja vrijednost Nx10 <sup>5</sup> stanica (T <sub>0</sub> )	Srednja vrijednost Nx10 <sup>5</sup> stanica (T <sub>24h</sub> )
0,1 nM	0,761	1,171	300	7,5	2,265
1 nM	0,996	1,054	350	5,625	0,781
10 nM	0,878	1,289	400	4,375	1,093
100 nM	0,781	1,035	450	4,218	0,156
2 μM	0,878	0,683	500	4,882	0
10 μM	0,82	0,82	550	4,062	0
50 μM	1,277	0,398	600	5	0
100 μM	4,492	0,351	650	7,968	0
200 μM	3,132	2,421	700	2,343	0
250 μM	6,406	4,609	750	5,429	0



**Slika 15.** Krivulja preživljenja euglena u laboratorijskoj zatvorenoj kulturi i prikaz NOAEL, LOAEL i LC<sub>50</sub> koncentracija karbendazima za euglenu tijekom akutne 24 satne izloženosti.

Tablica 5. i Slika 15. prikazuju postotke smrtnosti populacije euglena u zatvorenoj laboratorijskoj kulturi, tijekom 24 sata, pri različitim koncentracijama karbendazima. Tijekom 24 sata, koncentracije karbendazim u rasponu doza od 0,1 nM do 100 nM doza ne uzrokuje smrtnost populacije. NOAEL doza karbendazima za euglene u ovom pokus je kod 0,1 nM koncentracije karbendazima. LOAEL doza karbendazima koja bi djelovala na populaciju euglena je negdje oko 200  $\mu\text{M}$ . Povećanje postotka smrtnosti raste logaritamski raste od 100 nM do 100 000 nM tj. 100  $\mu\text{M}$ . LC 50 koncentracija karbendazima za euglene izložene 24h je 306  $\mu\text{M}$ . Sve iznad 300  $\mu\text{M}$  prati porast postotka smrtnosti oko 90 %, gdje sa povećanjem koncentracija pesticida dolazi do porasta postotka smrtnosti populacije, ali ipak oko 10 % rezistentnih stanica opstaje. Sve doze iznad 450  $\mu\text{M}$  karbendazima uzrokuju smrt stanica.

**Tablica 6.** Izračun vrijednosti prop (P), logit (P) i probit (P) pri različitim dozama pesticida u rasponu od 200  $\mu\text{M}$  do 450  $\mu\text{M}$  na početku tretiranja i nakon 24 satne izloženosti.

Koncentracija [ $\mu\text{M}$ ]	$N_{t0}$	$N_{t24}$	log C	žive st.	mrtve st.	prop, P	logit (P)	probit (P)
200	3,132	2,421	2,301	4,878	0,711	0,128	-1,918	3,864
250	6,406	4,609	2,398	5,878	1,797	0,163	-1,635	4,018
300	7,500	2,265	2,477	6,878	5,235	0,536	0,145	5,091
350	5,625	0,781	2,544	7,878	4,844	0,756	1,132	5,694
400	4,375	1,093	2,602	8,878	3,282	0,600	0,406	5,254
450	4,218	0,156	2,653	9,878	4,062	0,929	2,566	6,466

Izračunate vrijednosti prikazane u tablica 6. prikazuju logit (P) funkciju (inverzna logistička funkcija) i probit (P) funkciju (inverzna funkcija distribucije standardne normalne razdiobe). Vrijednosti log C dobivene su logaritmiranjem realnih koncentracija karbendazima, vrijednosti prop (P) dobivene su dijeljenjem broja mrtvih stanica sa ukupnim brojem stanica (žive + mrtve).

Vrijednost logit (P) izračunate su formulom:  $\text{logit (P)} = \ln \frac{\text{prop (P)}}{(1-\text{prop (P)})}$ ;

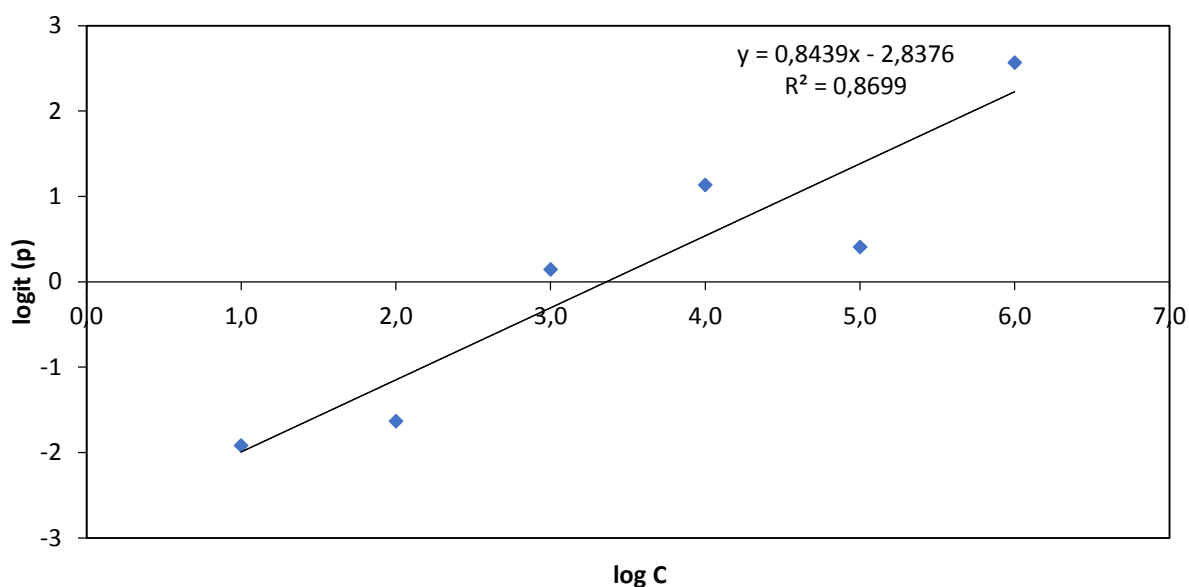
A probit (P) formulom:  $\text{probit (P)} = 5 + \text{norm.s.inv (prop (P))}$



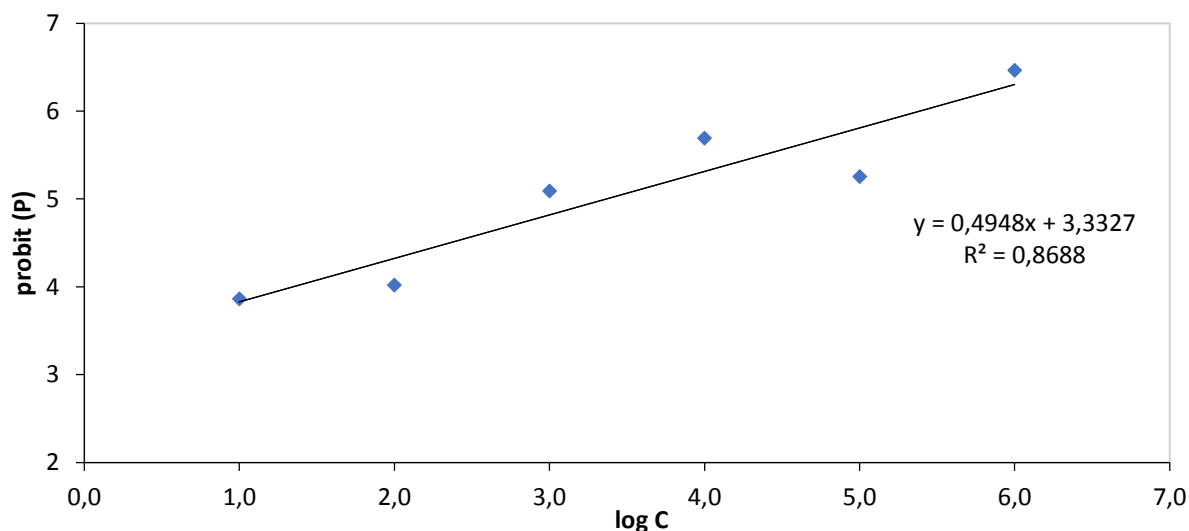
**Tablica 7.** Nagiba pravca, odsječka na osi y (intercept) i LC<sub>50</sub> koncentracija pesticida za euglenu tijekom akutne 24 satne izloženosti.

	<b>Logit (P)</b>	<b>Probit (P)</b>
<b>Nagib pravca</b>	11,97	7,03
<b>Odsječak na osi y</b>	-29,76	-12,49
<b>Test vrijednost</b>	0,00	5,00
<b>Log (C %)</b>	2,49	2,49
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>306,35</b>	<b>306,71</b>

U tablici 7. nagib pravca dobiven je korištenjem funkcije =slope (sve vrijednosti logit (P) stupca naspram svih vrijednosti log C stupca), na isti način dobivena je vrijednost odsječka na osi y korištenjem funkcije =intercept (sve vrijednosti probit (P) stupca naspram svih vrijednosti log C). Log C (%) dobivena je tako da se test vrijednost koja je nula oduzme od intercept vrijednosti i podijeli sa nagibom krivulje. Koncentracija karbendazima za LC<sub>50</sub> izračunata potenciranjem baze 10 sa vrijednosti log C(%) koncentracije.



**Slika 16.** Linearni prikaz ovisnosti logit (P) u ovisnosti o različitim koncentraciji primijenjene doze.



**Slika 17.** Linearni prikaz ovisnosti probit (P) u ovisnosti o različitim koncentraciji primijenjene doze.

Slika 16. i 17. prikazuju linearizaciju podataka distribucijske krivulje preživljenja preko kojih je izračunata  $LC_{50}$ .

### 3.2. Deskriptivni podaci vijabilnosti populacije *E. viridis*

**Tablica 8.** Vijabilnost populacije nakon tretiranja karbendazimom tijekom 24 sata.

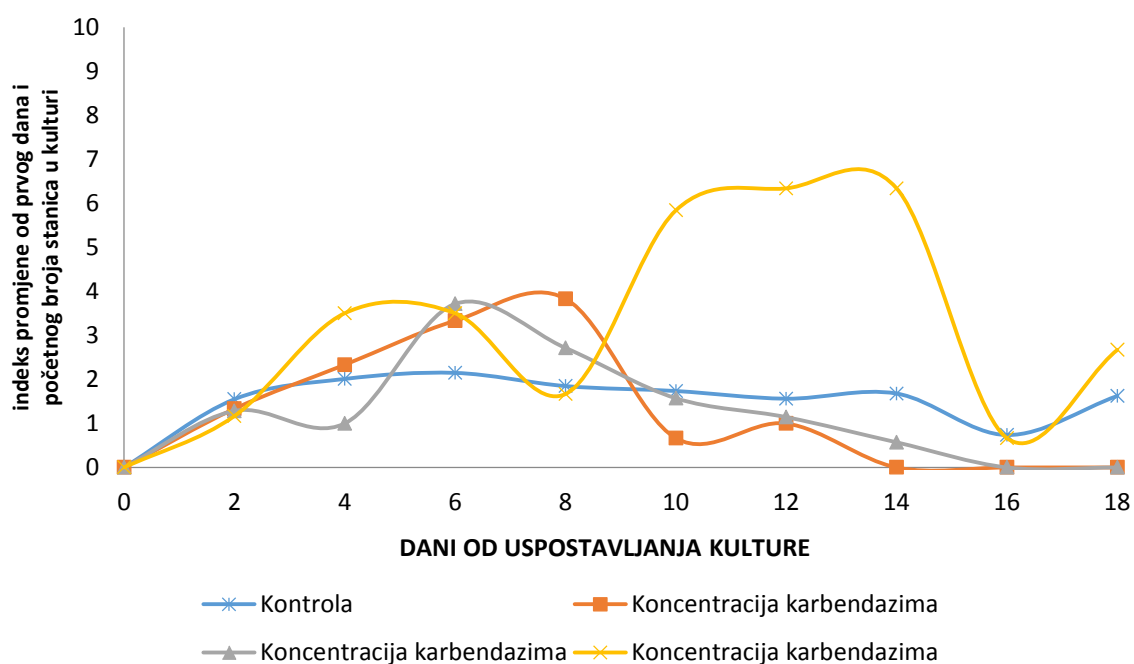
	MRTVE	SMEŽURANE	ŽIVE	NORMALNA	SLABA	NEPOKRETNE
<b>K (0)</b>	---	---	+++	+++	---	---
<b>0.1 nM</b>	+/----	---	+++	++-	+/----	+-
<b>1 nM</b>	+/----	+/----	++ +/-	++-	+-	+-
<b>10 nM</b>	+-	+/----	++ +/-	++-	+/----	++/-
<b>100 nM</b>	++ +/-	+-	++-	+ +/-	+ +/-	++-
<b>2 μM</b>	+-	+-	+ +/-	+-	++-	+++
<b>10 μM</b>	++-	++-	+ -	+-	+/-	+++
<b>50 μM</b>	---	+/----	+ +	++-	+/----	++-
<b>100 μM</b>	---	+/----	+++/-	+-	+/----	+++/-
<b>200 μM</b>	---	++/-	+++	+-	++/-	++-
<b>250 μM</b>	---	++/-	+++	+-	++/-	++-
<b>300 μM</b>	---	++-	+++	---	+-	+++
<b>350 μM</b>	---	++-	+++	---	+-	+++
<b>400 μM</b>	+/----	+++/-	+ -	---	+/----	+++
<b>450 μM</b>	+/----	+++/-	+ -	---	+/----	+++
<b>500 μM</b>	+-	+++/-	++/-	---	+/----	+++
<b>550 μM</b>	++-	+++/-	---	---	---	+++
<b>600 μM</b>	++-	+++/-	---	---	---	+++
<b>650 μM</b>	+++	+/----	---	---	---	+++
<b>700 μM</b>	+++	+/----	---	---	---	+++
<b>750 μM</b>	++-	+++/-	---	---	---	+++

Tablica 8. sadrži deskriptivne vrijednosti određivanja vijabilnosti stanica nakon tretmana populacije *E. viridis* sa različitim rasponom koncentracija pesticida (nanomolarne i milimolarne koncentracije). Već prilikom tretiranja malim dozama stanice postaju nepokretne, a povećava se i deformacija oblika stanice odnosno stanice postaju smežurane. Normalnu pokretljivost stanice zadržavaju tek pri vrlo niskim dozama pesticida.

### 3.3. Rezultati brojnosti euglena u zatvorenoj laboratorijskoj populaciji i trovanja tijekom 18 dana izloženosti pesticidu karbendazimu

Tablica 9. Srednje vrijednosti broja stanica u populaciji u kontroli koja nije bila izložena karbendazimu i tretmanima sa 50, 100 i 200  $\mu\text{M}$  koncentracijama karbendazima tijekom 18 dana tretmana pesticidom.

Dani	Kontrola		Koncentracije karbendazima					
	Bez karbendazima		50 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$		200 $\mu\text{M}$	
	Srednja vrijednost $\text{Nx}10^4$ stanica	S.D.	Srednja vrijednost $\text{Nx}10^4$ stanica	S.D.	Srednja vrijednost $\text{Nx}10^4$ stanica	S.D.	Srednja vrijednost $\text{Nx}10^4$ stanica	S.D.
0	1,042	$\pm 0,751$	0,585	$\pm 0,586$	0,683	$\pm 0,684$	0,585	$\pm 0,586$
2	1,615	$\pm 0,938$	0,781	$\pm 0,781$	0,878	$\pm 0,879$	0,683	$\pm 0,684$
4	2,096	$\pm 1,074$	1,367	$\pm 0,586$	0,683	$\pm 0,253$	2,050	$\pm 0,098$
6	2,239	$\pm 2,672$	1,953	$\pm 0,782$	2,539	$\pm 0,977$	2,050	$\pm 1,270$
8	1,927	1,444	2,246	1,856	1,855	0,684	0,976	0,586
10	1,809	$\pm 1,797$	0,390	$\pm 0,391$	1,074	$\pm 1,074$	3,417	$\pm 0,878$
12	1,627	$\pm 0,899$	0,585	$\pm 0,586$	0,781	$\pm 0,781$	3,710	$\pm 2,149$
14	1,751	$\pm 1,397$	0,000	$\pm 0,000$	0,390	$\pm 0,000$	3,710	$\pm 0,000$
16	0,768	$\pm 0,000$	0,000	$\pm 0,000$	0,000	$\pm 0,000$	0,390	$\pm 0,000$
18	1,692	0,000	0,000	$\pm 0,000$	0,000	$\pm 0,000$	$\pm 1,563$	0,000



**Slika 18.** Indeks promjene broja stanica u populaciji u kontroli koja nije bila izložena karbendazimu i tretmanima sa 50, 100 i 200  $\mu\text{M}$  koncentracijama karbendazima tijekom 18 dana tretmana pesticidom.

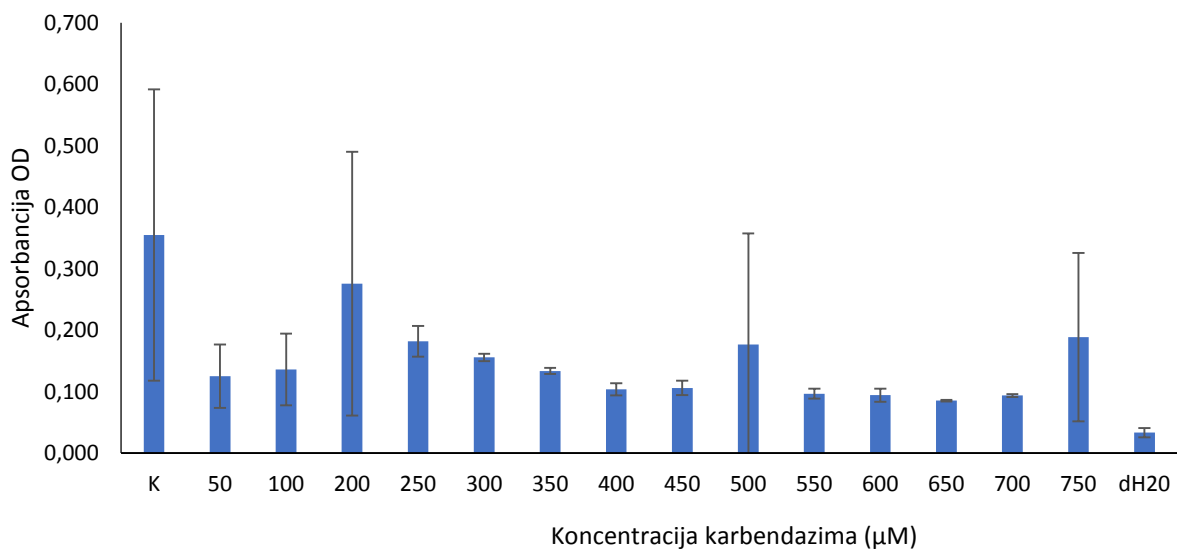
Indeks promjene brojnosti populacije *E. viridis* prikazan je u tablici 9. i na slici 18. tokom 18 dana tretiranja karbendazimom. Indeks promjene brojnosti koju predstavlja kontrolna skupina populacija netretiranih pesticidom pokazuje nagli rast populacije do 6 dana, kada ujedno dostiže i maksimalnu vrijednost broja stanica od  $2,096 \times 10^4$ . Nakon 6 dana brojnost počinje opadati, a trend se nastavlja do 12 dana. Između 12. i 16. dana javlja se oscilacija rasta i naglog pada brojnosti kada je dostignuta najmanja brojnost populacije od  $0,786 \times 10^4$ , nakon čega dolazi do ponovnog oporavka populacije i strmog rasta do 18 dana. Kretanje krivulje indeksa promjene brojnosti populacije euglena u zatvorenoj kulturi može se opisati donekle sigmoidalnom linijom koju kontinuirano prati rast i pad populacije.

### 3.4. Enzimi

#### 3.4.1. LDH test izloženosti *E. viridis*

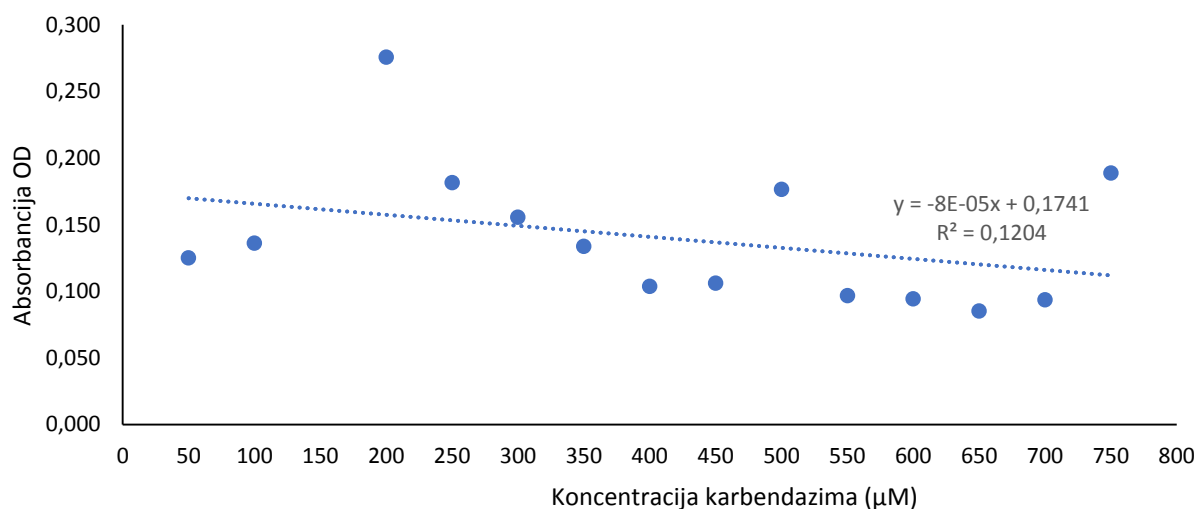
**Tablica 10.** Izmjerene vrijednosti apsorbancije LDH testom pri različitim dozama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti i njihova srednja vrijednost  $\pm$  S.D.

LDH [ $\mu\text{M}$ ]	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	LDH [ $\mu\text{M}$ ]	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
<b>K</b>	0,355	$\pm 0,237$	<b>450</b>	0,106	$\pm 0,012$
<b>50</b>	0,125	$\pm 0,052$	<b>500</b>	0,177	$\pm 0,181$
<b>100</b>	0,136	$\pm 0,058$	<b>550</b>	0,097	$\pm 0,008$
<b>200</b>	0,276	$\pm 0,215$	<b>600</b>	0,094	$\pm 0,011$
<b>250</b>	0,182	$\pm 0,025$	<b>650</b>	0,085	$\pm 0,001$
<b>300</b>	0,156	$\pm 0,006$	<b>700</b>	0,094	$\pm 0,003$
<b>350</b>	0,134	$\pm 0,005$	<b>750</b>	0,189	$\pm 0,137$
<b>400</b>	0,104	$\pm 0,010$	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	0,033	$\pm 0,007$



**Slika 19.** Vrijednosti apsorbancije LDH testom pri različitim dozama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti. rasponu koncentracija od 50 µM do 750 µM, vrijednosti u stupcima prikazani su kao srednja vrijednost sa ± S.D.

Tablica 10. i slika 19. prikazuje vrijednosti apsorbancije dobivene LDH testom, kod različitih koncentracija pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti zatvorene laboratorijske kulture euglena. Uočava se da doze od 50 µM pa do kraja raspona, ujednačeno djeluju na blokiranje aktivnosti enzima LDH u euglenama, i inhibiraju je za 60-80 % u odnosu na normalnu aktivnost LDH u kontrolnoj skupini. Premda su sve vrijednosti apsorbancije manje od kontrole, vrijednosti apsorbancije kod koncentracija od 200 µM, 500 µM i 750 µM pokazuju neobično visoku apsorbanciju i veliku standardnu devijaciju što pokazuje odstupanje od prosječnih vrijednosti ostalih koncentracija.



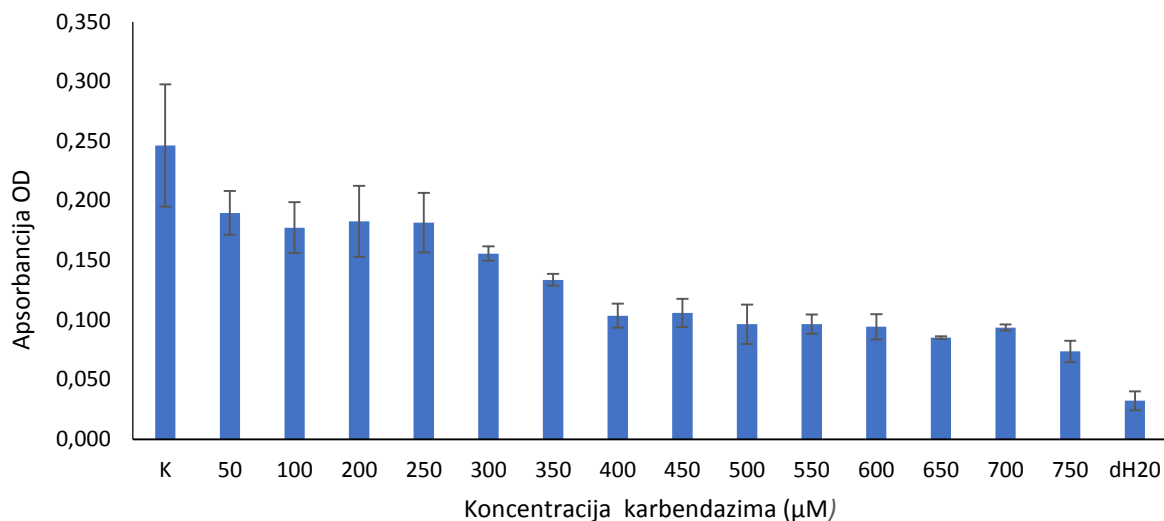
**Slika 20.** Korelacijski graf LDH apsorbancije OD (*engl. optical density*) nakon izloženosti zatvorene kulture euglena pesticidu karbendazimu tijekom 24 sata izloženosti.

Slika 20. Prikazuje korelacijsku analizu opadanja aktivnosti enzima u LDH testu. Korelacijska analiza pokazuje vrlo slabu povezanost opadanja aktivnosti LDH-a od  $R^2$  koeficijenta korelacije 0.120 sa porastom doze karbendazima tijekom 24 sata izloženosti.

### 3.4.2. MTS test izloženosti *E. viridis*

**Tablica 11.** Vrijednosti apsorbancije MTS testa pri različitim dozama pesticida i njihova srednja vrijednost  $\pm$  S.D.

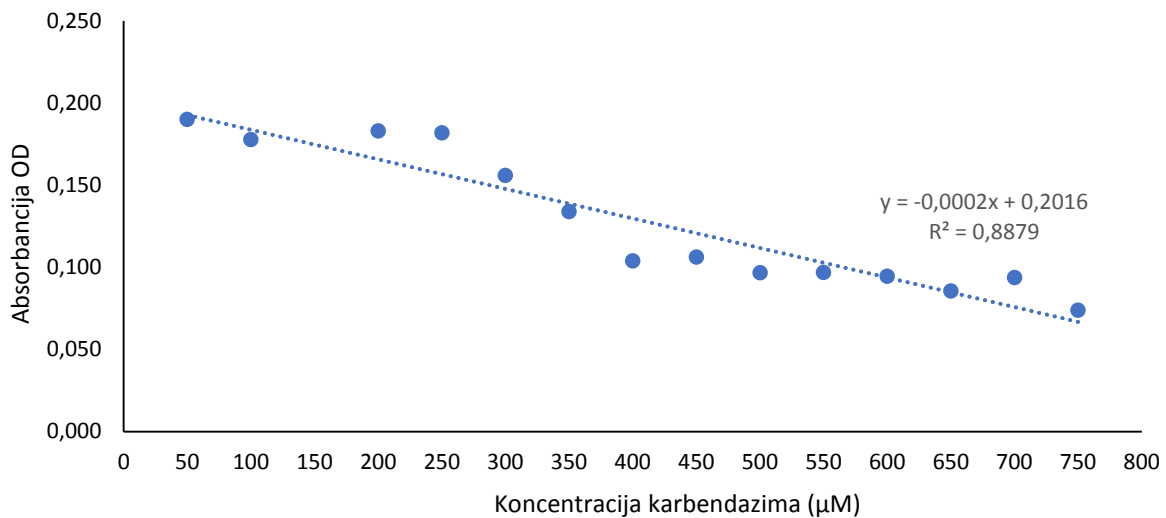
MTS [ $\mu$ M]	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	MTS [ $\mu$ M]	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
<b>K</b>	0,246	$\pm$ 0,051	<b>450</b>	0,106	$\pm$ 0,012
<b>50</b>	0,190	$\pm$ 0,018	<b>500</b>	0,096	$\pm$ 0,016
<b>100</b>	0,178	$\pm$ 0,021	<b>550</b>	0,097	$\pm$ 0,008
<b>200</b>	0,183	$\pm$ 0,030	<b>600</b>	0,094	$\pm$ 0,011
<b>250</b>	0,182	$\pm$ 0,025	<b>650</b>	0,085	$\pm$ 0,001
<b>300</b>	0,156	$\pm$ 0,006	<b>700</b>	0,094	$\pm$ 0,003
<b>350</b>	0,134	$\pm$ 0,005	<b>750</b>	0,074	$\pm$ 0,009
<b>400</b>	0,104	$\pm$ 0,010	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	0,032	$\pm$ 0,008



**Slika 21.** Vrijednosti apsorbancije MTS testom pri različitim dozama pesticida u rasponu od 50  $\mu$ M do 750  $\mu$ M], vrijednosti u stupcima prikazani su kao srednja vrijednost sa  $\pm$  S.D.

Tablica 11. i slika 21. prikazuju vrijednosti apsorbancije izmjerene MTS testom pri različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 24 sata izloženosti. U odnosu na kontrolu, jasno se vidi kontinuirano pad apsorbancije od najmanje koncentracije (50  $\mu$ M) prema najvećoj koncentraciji pesticida (750  $\mu$ M). U rasponu doza od 50  $\mu$ M do 300  $\mu$ M

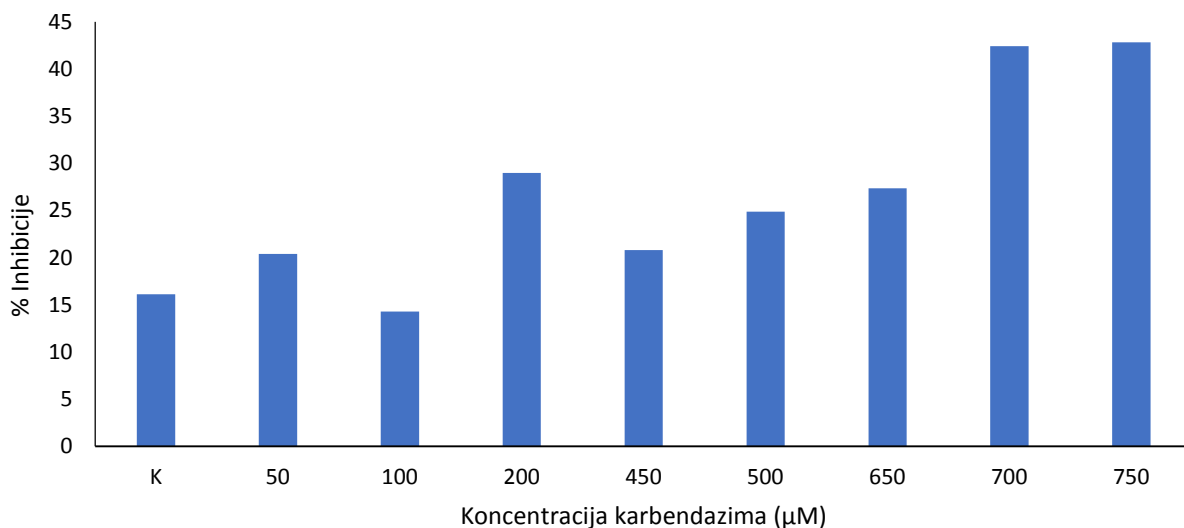
karbendazima, pad aktivnosti enzima MTS je za oko 30 % u odnosu na kontrolu, u cijelom rasponu. Nakon doze od 300  $\mu\text{M}$  karbendazima ovaj pad aktivnosti je i veći i u rasponu doza od 300- 700  $\mu\text{M}$  i iznosi 60 % manje aktivnosti nego u kontrolnih životinja. Izuzetno niska aktivnost sa 60 % vrijednosti manje u odnosu na kontrolu zadržava se u rasponu doza između 400  $\mu\text{M}$  do 600  $\mu\text{M}$  koncentracije karbendazima.



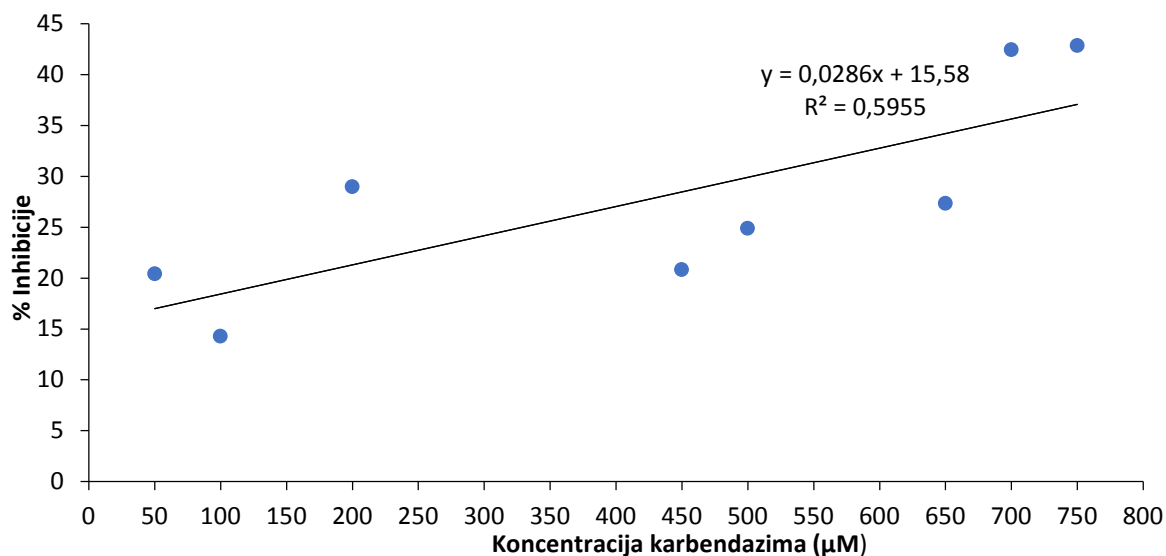
**Slika 22.** MTS apsorbancije OD (*engl. optical density*) nakon izloženosti zatvorene kulture euglena pesticidu karbendazimu tijekom 24 sata izloženosti.

Slika 22. prikazuje korelacijsku analizu opadanja aktivnosti enzima u MTS testu. Korelacijska analiza pokazuje izuzetno jaku povezanost opadanja aktivnosti MTS-a od  $R^2$  koeficijenta korelacije 0.887 sa porastom doze karbendazima tijekom 24 sata izloženosti.

### 3.4.3. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod vrste *E. viridis*



**Slika 23.** Inhibicija SOD enzima pri različitim dozama pesticida u rasponu od 50  $\mu\text{M}$  do 750  $\mu\text{M}$  nakon 24 sata izloženosti zatvorene kulture euglena.



**Slika 24.** Inhibicije SOD nakon izloženosti zatvorene kulture euglena pesticidu karbendazimu tijekom 24 sata izloženosti.

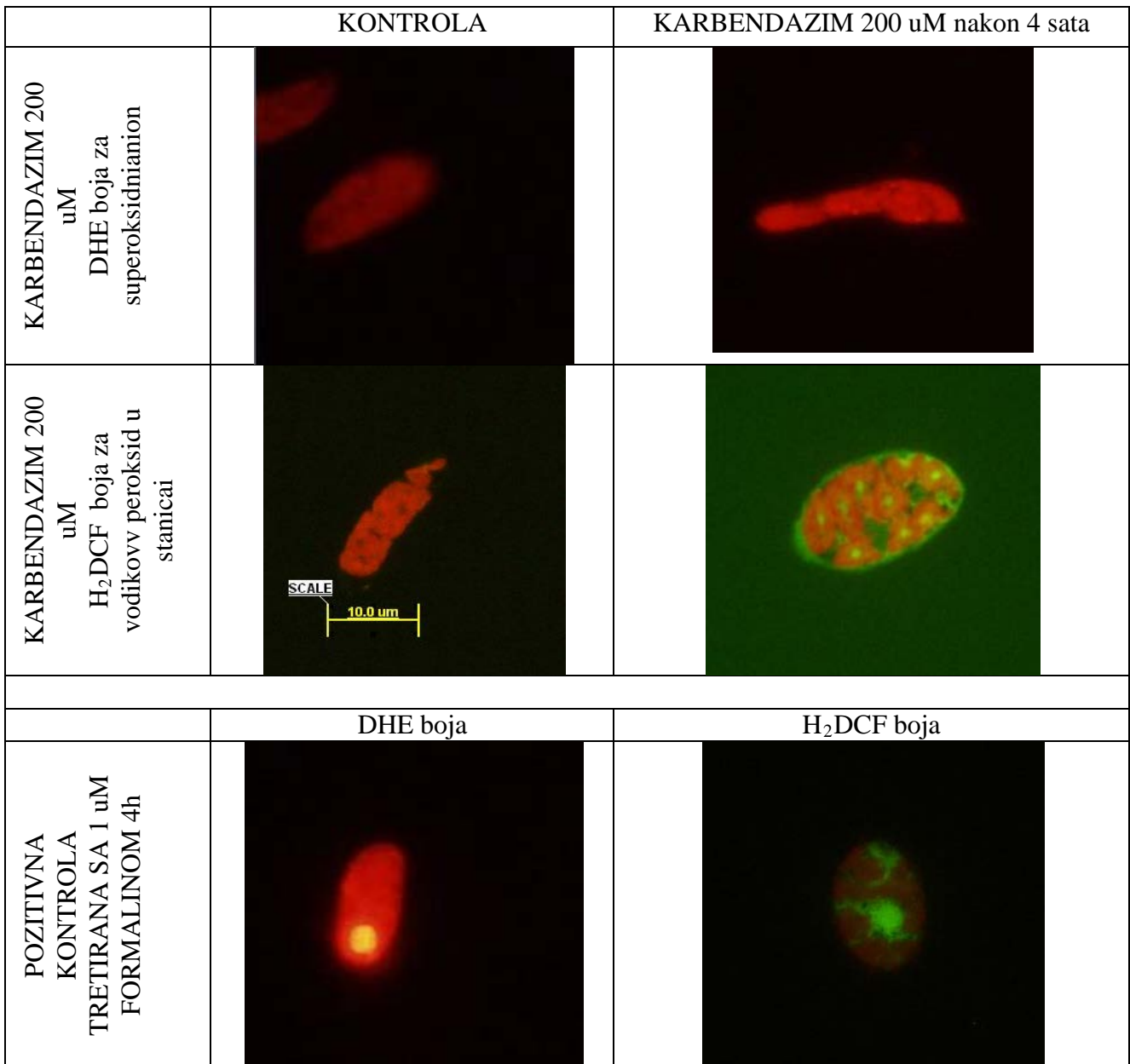
Aktivnost glavnog antioksidativnog enzima superoksid dismutaze (SOD), prikazana kao % inhibicije oksidacije citokroma c sa superoksidnim anionom, pokazuje da je izloženost pesticidu karbendazimu inducirala aktivnost SOD-a. Pri izloženosti koncentracijama od 50  $\mu\text{M}$  ili 100  $\mu\text{M}$  povećanje aktivnosti enzima bilo je neznatno u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanjem koncentracije karbendazima iznad 200  $\mu\text{M}$ , aktivnost enzima se inducirala za približno 2-2.5 puta u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **3.5. Fluorescencijsko-mikroskopska detekcija intracelularne razine slobodnih radikala superoksidnog aniona fluorescentnom bojom DHE i razine vodikovog peroksida bojom $\text{H}_2\text{DCF}$ u *E. viridis* pri različitim koncentracijama pesticida karbendazima tijekom 4 sata izloženosti.**

Mikrografije euglene iz kontrolne skupine i nakon 4 sata izloženosti karbendazimu (200  $\mu\text{M}$ ). Prikazane su na Slici 25. Prvi red prikazuje blagi porast intenziteta fluorescencije boje DHE koja ukazuje na blago povećanje količine superoksidnog aniona. U drugom redu uočava se vrlo intenzivno pojačanje zelene fluorescencije koja je karakteristična za reakciju boje  $\text{H}_2\text{DCF}$  i unutarstaničnog vodikovog peroksida koji se nakuplja pri pojačanom oksidativnom stresu. U trećem redu prikazane su pozitivne kontrole, odnosno stanice tretirane



formalinom (1  $\mu\text{M}$ ), što je standardna toksična tvar za izazivanje povećanje oksidativnog stresa unutar stanica.



**Slika 25.** VIS i Fluorescentna mikroskopija euglena, obojanih vitalnim bojama DHE i H<sub>2</sub>DCF.

## 4. RASPRAVA

Pri akutnim koncentracijama, tijekom 24 sata, karbendazim u rasponu doza od 0,1 nM do 100 nM doza ne uzrokuje smrtnost populacije. NOAEL doza karbendazima za euglene, u ovom pokus mogla bi se pripisati 0,1 nM koncentraciji karbendazima. LOAEL doza karbendazima koja bi djelovala na populaciju euglena je negdje oko 100  $\mu$ M.

Sve doze iznad 450  $\mu$ M karbendazima uzrokuju smrt stanica, međutim moguće je da stanice dožive šok te preživljavaju u obliku spora koje zatim padaju na dno posude stoga se prilikom brojanja stanica ne uočavaju. Ne postoje podatci u literaturnim izvorima o NOAEL, LOAEL i LC<sub>50</sub> koncentracijama za ovaj pesticid na ispitivanoj vrsti *E. viridis*, stoga pretpostavljamo da ovi podatci imaju važnost kao simulacija mogućeg utjecaja rezidualnog pesticida karbendazima u prirodi. Moglo bi se pretpostaviti da bi iste koncentracije (primjerice 400  $\mu$ M) i u prirodi mogle uzrokovati uništenje ukupnih populacija euglene na pojedinom lokalitetu.

I u manjim dozama karbendazim uzrokuje stres u *E. viridis*. Prilikom tretiranja malim dozama 1-10 nM jedan dio stanica postaje nepokretan, a već pri dozi od 2  $\mu$ M većina stanice postaju nepokretne. Djelomično su pojedine (očito najosjetljivije stanice) smežurane, odnosno kontrahirane, pri niskim dozama od 2-10  $\mu$ M, ali se većina stanica smežurala pri dozama 10  $\mu$ M i više. Kontrakcija stanica je kod euglene znak šoka. Vrste roda *Euglena* mijenjaju oblik stanica kao odgovor na povećanje koncentracija polutanata, kemijskog ili fizičkog stresora (Azizullah i sur., 2010; Conforti 1998; Mikolajczyk i Diehn 1978; Murray 1981; Takenaka i sur., 1997).

Karbendazim osim izravno na ponašanje životinja utječe i na stanični metabolizam. Primjerice rezultati pokazuju da je u koncentracijama od 50  $\mu$ M do 300  $\mu$ M karbendazima, uočen pad aktivnosti enzima MTS za oko 30 %. Pri povećanim koncentracijama karbendazima primjerice od 300 - 700  $\mu$ M inhibicija enzima iznosi 60 % manje u odnosu na kontrolu

Korelacijska analiza pokazala je izuzetno jaku povezanost opadanja aktivnosti MTS-a od R<sup>2</sup> koeficijenta korelacije 0.887 i izravno je povezana i recipročna sa s porastom doze odnosno okolišne koncentracije karbendazima u kulturi *E. viridis*. Iako je malo literaturnih izvora koje koriste ovaj parametar u vrste *E. viridis*, postoje neki podatci kojima se može usporediti rezultate u ovom radu. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju koje su proveli Peng i sur., (2015) na srodnoj vrsti *E. gracilis*, a koje pokazuje da pojedninačni spojevi kao i

mješavina BTEX-a u rasponu od 50 – 500  $\mu\text{M}$  uzrokuje morfološke promjene stanice, promjenu oblika i formaciju unutarstaničnog lipofuscina i smanjenje sadržaja klorofila.

Nadalje, rezultati pokazuju da doze od 50  $\mu\text{M}$  pa do kraja raspona koncentracija karbendazima (750  $\mu\text{M}$ ), ujednačeno djeluju na blokiranje aktivnosti enzima LDH u euglenama i inhibiraju je za 60-80 % u odnosu na normalnu aktivnost LDH u kontrolnoj skupini.

Čini se da je metabolički važan enzim poput LDH koji reverzibilno pretvara laktat u piruvat u stanicama izuzetno osjetljiv na karbendazim. Naime LDH aktivnost ne opada proporcionalno rastućoj dozi tj. LDH pokazuje vrlo slabu povezanost opadanja aktivnosti od  $R^2$  koeficijenta korelacije 0.120 sa porastom doze karbendazima tijekom 24 sata izloženosti. Ovakav rezultat znači da enzim LDH, odnosno ukupni metabolizam piruvata i laktata u stanici euglena nije povezan sa porastom doze nego da već i najmanja primijenjena doza odmah djeluje na poremećaj metabolizma u stanici. Metabolizam eugleninih stanica je poremećen već od okolišne koncentracije karbendazima od 50  $\mu\text{M}$ , jer je blokirana aktivnost enzima LDH za 60-80 %.

Enzim LDH odnosno ukupni metabolizam piruvata i laktata u stanici euglena nije povezan sa porastom doze, već i najmanja prisutnost karbendazima (od 50  $\mu\text{M}$  pa na više) uzrok poremećaja metabolizma u stanici, što pokazuje da doze od 50  $\mu\text{M}$  uzrokuju stres stanica (kontrakciju) i metabolički stres. Međutim, rezistentne stanice u populaciji imaju tendenciju razmnožavanja i naglog povećanja broja stanica u populaciji od 2-4 dana.

Povežemo li ovakav nalaz o redukciji metaboličke aktivnosti inhibicijom centralnog metaboličkog enzima, sa tablicom 8, gdje se već i pri nižim dozama javlja kontrakcija stanica, i nedostatak kretanja možemo zaključiti da i niže doze od 50  $\mu\text{M}$  uzrokuju stres stanica i metabolički stres. Također, poremećaj u centralnom enzimu u energetskim metaboličkim putevima može se povezati i sa činjenicom da je većina stanica nepokretna pri malim dozama jer energija za kontrakciju fibrila dolazi od ATP-a koji se proizvodi u mitohondrijima kinetosoma.

Kada bismo ekstrapolirali ovakve rezultate o ukupnoj populaciji gdje je prisutna redukcija LDH enzima od 60-80 %, na ekosustave kopnenih voda, tada možemo reći da je ovo vrlo važan podatak koji govori da i najmanja prisutnost karbendazima u okolišu ili ekosustavima ima mogućnost reducirati za više od pola metaboličku izmjenu tvari i ukupni protok energije kao i biološku produkciju na određenoj trofičkoj razini ili ekološkoj niši koju zauzima *E. viridis* u prirodi.

Čini se da rezultati ukazuju da je uslijed poremećaja metabolizma i biokemijskih reakcija unutar stanice poremećaj redoks ravnoteže uzrokovao intracelularni oksidacijski stres.

Naime, blagi porast intenziteta fluorescencije boje DHE koja ukazuje na blago povećanje količine superoskidnog aniona. U drugom redu uočava se vrlo intenzivno pojačanje zelene fluorescencije koja je karakteristična za reakciju boje H<sub>2</sub>DCF i unutarstaničnog vodikovog peroksida koji se nakuplja pri pojačanom oksidativnom stresu.

Poremećaj metabolizma (temeljem LDH testa) indirektno prati i promjena unutarstanične redoks ravnoteže biokemijskih reakcija. Blagi porast intenziteta fluorescencije boje DHE koja ukazuje na blago povećanje količine superoskidnog aniona. Međutim unutar stanica (pri dozi od 200 μM) dolazi do intenzivno stvaranja unutarstaničnog vodikovog peroksida. I povećana aktivnost enzima SOD, približno 2-2.5 puta više u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazuje da su stanice pod pojačanom oksidativnim stresom.

Povećanjem koncentracije karbendazima iznad 200 μM, aktivnost enzima se inducirala za približno 2-2.5 puta u odnosu na kontrolnu skupinu. Oksidacijski stres kao posljedica poremećene metaboličke redoks ravnoteže energetskih reakcija (primjerice laktat-piruvat kataliziranih laktat dehidrogenazom) zajednički je mehanizam toksičnosti različitih ksenobiotika (Garza i sur. 2008, Hu i sur. 2015). Ahme i Rodrigues (2013) su identificirali znatno veću proizvodnju slobodnih kisikovih radikala (ROS) u uzorcima otpadnih voda koje sadrže različite mješavine otrovnih tvari. Hu i sur. (2015) pokazali su da parametri oksidacijskog stresa poput primjerice razine MDA tj. lipidne peroksidacije, u stanicama *E. gracilis* nakon 10 dnevne izloženosti imaju izravnu vezu sa povećanjem doze. Aktivnosti katalaze (CAT) i superoksidne dismutaze (SOD) *E. gracilisa* bili su značajno ( $P < 0,01$ ) inducirani u usporedbi s kontrolom već pri nižim koncentracijama istraživanih. Odnosno, uspoređujući naše rezultate, može se reći da je sličan način poremećaja najfinije biokemijske redoks ravnoteže uslijedio odmah pri dodiru sa karbendazinom, i u manjim dozama koji ne uzrokuju smrtnost, već čak djeluju stimulatивно na razmnožavanje stanica, ali se indukcija enzima povećava u populacijama i koncentracijama gdje je jedan dio stanica već odumro, što bismo mogli protumačiti da stanice koje su preživjele imaju veću sposobnost indukcije antioksidativne obrane, i kao takve zaostaju, dijele se i samim time u svakom slijedećem mjerenju uzrokuju povećanje količine antioksidativnih enzima (u ovom slučaju SOD-a).

U literaturi učinci pesticida na vrste roda *Euglena*, pokazali su se jačima kod kratkotrajnog negoli kod dugotrajnog izlaganja vrste pesticidima. Stopa rasta vrste značajnije je opala kod koncentracije karbofurana od 50 mg L<sup>-1</sup> dok prisutnost malationa pri svim

ispitivanim koncentracijama nije utjecao na rast populacije. Rezultati dugoročnog izlaganja vrste pesticidima su pokazali da navedeni pesticidi negativno utječu na oblik stanice, brzinu kretanja, pokretljivost, orijentaciju vrste te proces fotosinteze (Azilullah, 2011). Literaturni izvori govore da manje koncentracije mogu inducirati rast populacije i da se stanice mogu oporaviti unutar 48–72 sata. Kod koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  ili više dolazi do opadanja rasta populacije i nakon tih koncentracija stanice se više nisu u stanju oporaviti te dolazi do gubitka boje, odnosno kloroplasta. Tretiranje stanica visokim koncentracijama (3  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ ) uzrokuje 95 % smrti stanica nakon 24 sata, također su zabilježene granulirane i abnormalne stanice, promijenjena oblika i boje (Peng i sur., 2015). Neki radovi govore kako i male koncentracije od 1 ili 10 ppm određenih pesticida mogu negativno djelovati na populaciju vrste u prvih 24 h izloženosti, ali pri izloženosti dužom od 24 h dolazi do značajnog smanjenja gustoće populacije pri svim ispitivanim koncentracijama (Rao i sur., 2007; Hikal i sur., 2015).

Slično sa navedenim literaturnim izvorima je uočeno i u ovom radu jer rezultati populacijske dinamike tijekom 18 dana govore o logaritamskom rastu populacije kontrole koja počinje blago oscilirati nakon 4 dana ali održava stalno ravnotežno stanje sve do 16 dana kada počinje propadati. Obrnuto karbendazim prisutan u različitim dozama (50-200  $\mu\text{M}$ ) mijenja dinamiku na nalik opisan prethodno u literaturi uzrokujući naglu smrt osjetljivih stanica ali i brz i povećan rast rezistentnih stanica koje ne dosežu ravnotežno oscilirajuće stanje nego vrlo brzo nakon naglog povećanja broja stanica dolazi do njihovog kontinuiranog opadanja bez uspostavljanja stanja oscilatorne ravnoteže od nekoliko dana.

## 5. ZAKLJUČAK

- Pri akutnim koncentracijama, tijekom 24 sata karbendazim u koncentracijama od 0.1 nM do 100 nM doza ne uzrokuje smrtnost populacije.
- NOAEL koncentracija karbendazima koja ne uzrokuje smrt stanica u populaciji za euglene iznosi 0,1 nM.
- LOAEL doza karbendazima koja bi djelovala na populaciju euglena je 200  $\mu$ M te pri kojoj se uočavaju prvi postotci smrtnosti stanica u populaciji.
- LC<sub>50</sub> doza karbendazima za populaciju euglena je 306,35  $\mu$ M.
- Sve doze iznad 450  $\mu$ M karbendazima uzrokuju 90-100 % smrt euglena u populaciji.
- Pri 1-10 nM koncentracijama karbendazima dolazi do prestanka kretanja stanica, a već pri dozi od 2  $\mu$ M većina stanice u populaciji postaju nepokretne. Najosjetljivije stanice su u šoku (kontrakcija stanica) od 2-10  $\mu$ M, ali se većina stanica smežurala pri dozama 10  $\mu$ M i više.
- Metabolizam eugleninih stanica je poremećen za 60-80 % već od 50  $\mu$ M karbendazima, jer je blokirana aktivnost enzima LDH. Ovakvo smanjenje aktivnosti i jednaki učinak koji je postignut pri navedenoj dozi i ne kreće se proporcionalno sa povećanjem koncentracije jer pokazuje vrlo slabu povezanost.
- Enzim LDH odnosno ukupni metabolizam piruvata i laktata u stanici euglena nije povezan sa porastom doze već i najmanja prisutnost karbendazima (od 50  $\mu$ M pa na više) uzrokuje poremećaj metabolizma u stanici.
- Doze od 50  $\mu$ M karbendazima uzrokuju stres stanica (kontrakciju) i metabolički stres međutim rezistentne stanice u populaciji imaju tendenciju razmnožavanja i naglog povećanja broja stanica u populaciji od 2-4 dana.

- Poremećaj metabolizma (temeljem LDH testa) indirektno prati i promjena unutarstanične redoks ravnoteže biokemijskih reakcija. Blagi porast intenziteta fluorescencije boje DHE koja ukazuje na blago povećanje količine superoskidnog aniona. Međutim unutar stanica (pri dozi od 200  $\mu\text{M}$ ) dolazi do intenzivnog stvaranja unutarstaničnog vodikovog peroksida. I povećana aktivnost enzima SOD, približno 2-2.5 puta više u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazuje da su stanice pod pojačanim oksidativnim stresom.

## 6. LITERATURA

- Adedara I.A, Vaithinathan S, Jubendradass R., Mathur P.P, Farombi E.O. 2013. Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, **35** (3), 444-453.
- Ahmed F, Rodrigues D.F. 2013. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: a case study. *Journal of hazardous materials*. 256–257, 33–39.
- Azizullah A, Richter P, Häder D.P. 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*, **20**, 1442-1454.
- Bentley K.S, Kirkland D, Murphy M, Marshall R. 2000. Evaluation of thresholds for benomyl-and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **464**, 41-51.
- Calvayrac R., Laval-Martin D, Briand J, Farineau J. 1981. Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O<sub>2</sub> pressure. *Planta*, **153**, 6-13.
- Chatupote W, Panapitukkul N. 2005. Regional assessment of nutrient and pesticide leaching in the vegetable production area of Rattaphum catchment, Thailand. *Water Air Soil Pollut Focus* **5**, 165–173.
- Christ O, H-M. Kellner. 1973. Animal tests with Carbendazim (W 17411). Hoechst RCL, Germany. Report no. A02763. Unpublished data.
- Coleman R.D, Coleman R.L, Rice E.L. 2015. Zinc and Cobalt Bioconcentration and Toxicity in Selected Algal Species. *Botanical Gazette*, **132**, 102 – 109.
- Conforti V. 1998. Morphological changes of Euglenophyta in response to organic enrichment. *Hydrobiologia* **369**, 277–285.
- Daam M, Satapornvani K, den Brink P, Nogueir A. 2010. Direct and Indirect Effects of the Fungicide Carbendazim in Tropical Freshwater Microcosms. *Arch Environ Con Tox* **58**, 315–324.
- Delp C.J. 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Disease* **64**, 652-657.



- Dive D, Leclerc H, Persoone G. 1980. Pesticide Toxicity on the Ciliate Protozoan Colpidium campy/urn : Possible Consequences of the Effect of Pesticides in the Aquatic Environment. *Ecotoxicology and environmental safety* **4**, 129- 133.
- Dorn E, Schmidt E, Kellner H.M, Leist K.H. 1983. HOE 017411-14-C (carbendazim- 14C) metabolic fate in rats and mice, a comparison. Hoechst AG, Frankfurt, Germany. Unpublished data.
- Douch P.G.C. 1973. The metabolism of benomyl fungicide in mammals. *Xenobiotica*, **10**, 120-132.
- Dujardin F. 1841. Histoire Naturelle des Zoophytes. Infusoires, comprenant la Physiologie et la Classification de ces Animaux, et la Manière de les Étudier a l'aide du Microscope. Paris, str. 358.
- Dutta J. 2015. Effect of cypermethrin on the growth of ciliate protozoan Paramecium caudatum. *Toxicology international*, **22**, 100.
- EC (2007): European Commission,  
[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list\\_carbendazim.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_carbendazim.pdf);  
 pristupljeno 6.7.2017.
- Ehrenberg C. 1830. Organisation, Systematik und geographisches Verhältnifs der Infusionsthierchen. Berlin, **2**, 58-9.
- Ekelund F, Ronn r, Christensen S. 1994. The Effect of Three Different Pesticides on Soil Protozoan Activity. *Pestic. Sci.*,**42**, 71-78.
- Ellen, 1922. Euglena Viridis (Ehrenberg.). *Am Midl Nat* **8**, 149.
- Farag A, Ebrahim H, El Mazoudy R., Kadous E. 2011. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **92**, 122-130.
- Fawole O.B, Aluko M., Olowonihi T.E. 2010. Effects of a Carbendazim-Mancozeb fungicidal mixture on soil microbial populations and some enzyme activities in soil. *Agrosearch*, **10**, 1-2.
- FERA 2017. Food and Environment Research Agency, <https://secure.fera.defra.gov.uk/pusstats/myindex.cfm>, pristupljeno 28. 8. 2017.
- Gardiner J.A, Kirkland J.J, Klopping H.L, Sherman H. 1974. Fate of benomyl in animals. *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 419-427.

- Garza K.M., Soto K.F, Murr L.E. 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *International Journal of Nanomedicine*, **3**, 83–94.
- Gray J. 1928.. Ciliary Movement. Cambridge Univ. Press, London and New York.
- Gray, L.E, Ostby J, Linder, R. Goldman, J, Rehnberg, G., Cooper, R. 1990. Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster. *Fundamental and Applied Toxicology*, **15**, 281-297.
- Hammond L.A., Davidson K, Lawrence R., Camden J.B, Von Hoff D.D, Weitman S, Izbicka, E. 2001. Exploring the mechanisms of action of FB642 at the cellular level. *Journal of cancer research and clinical oncology*, **127**, 301-313.
- Hikal W M, Al-Herraw, A.Z, El-Daly E.S, Elowa S. E. 2015. Inhibitory Effect of Some Pesticides on the Freshwater Amoebae *Vahlkampfia Ustina*. *International Journal of Environmental Planning and Management*, **1**, str. 63-68.
- Holwill M. 1966. The motion of *Euglena viridis*: the role of flagella. *Journal of Experimental Biology* **44**, 579-588.
- Hu C, Wang Q, Zhao H, Wang L, Guo S, Li X. 2015. Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*. *Chemosphere*, **128**, 184-190.
- Huan Z, Luo J, Xu Z, Xie D. 2016. Acute toxicity and genotoxicity of carbendazim, main impurities and metabolite to earthworms (*Eisenia foetida*). *Bull Environ Contam Toxicol* **96**, 62–69.
- IPC INCHEM. 2017. International programme for chemical safety, <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr19.htm>, pristupljeno 27.07.2017.
- Jordan E.L, Verma P.S. 2009. *Invertebrate zoology*. S. Chand & Company.
- Kershaw D.R. 1988. *Animal Diversity*. Chapman and Hall, London, 18 – 20.
- Kosasa T, Kuriya Y, Matsui K, Yamanishi Y. 1999. Effect of donepezil hydrochloride (E2020) on basal concentration of extracellular acetylcholine in the hippocampus of rats. *European journal of pharmacology*, **380**, 101-107.
- Leedale G.F. 1968. *Biology of Euglena*. Ur. DE Buetow. Academic Press, New York .
- Lowndes A.G. 1944. The swimming of unicellular flagellate organisms. *Proc. Zool. Soc. Lond.* **113**, 90-107.

- Lu S.Y, Lia, J.W, Kuo M.L, Wang S.C, Hwang J.S, Ueng T.H, 2004. Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats. *J Toxicol Environ Heal Part* **67**, 1501–1515.
- Ludwikowska A, Bojarski B, Socha M, Lutnicka H, Trzeciak KB. 2013. The effect of carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and hatching. *Arch Polish Fisheries* **21**, 367–371.
- Mantovani A, Maranghi F, Ricciardi C, Macrì C, Stazi A.V, Attias L, Zapponi G.A. . 1998. Developmental toxicity of carbendazim: comparison of no-observed-adverse-effect level and benchmark dose approach. *Food and Chemical Toxicology*, **36**, 37-45.
- Mazellier P, Leroy E, Legube B. 2002. Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in the diluted aqueous solution. *Journal Photochem. Photobiol. A. Chem.* 221-227.
- Mikolajczyk E, Diehn B. 1978. Morphological alteration in *Euglena gracilis* induced by treatment with CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and Triton X-100: correlations with effects on photophobic behavioral responses. *J Protozool* **25**, 461–470.
- Miliša M, Đikić D, Mandić T, Grozić D, Čolić I, Ostojić A. 2017. Response of aquatic protists to electric field exposure. *Intern. Journ. of Radiation Biology*, 93, 818-830
- Minta M, Wilk I, Żmudzki J. 2004. Embryotoxicity of carbendazim in rat and hamster micromass cultures. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. **48**, 481-484.
- Monfils A.K, Triemer R.E, Bellairs E.F. 2011. Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia*. **50**, str.156.
- Muller F, Ackerman P, Margot, P. 2011. Fungicides, Agricultural, 2. Individual Fungicides, DOI: 10.1002/14356007.o12\_o06.
- Müller O.F, Fabricius Otto. 1786. *Animalcula Infusoria, Fluvia Tilia et Marina. Haunia, Typis N. Mölleri.* str. 126, 473.
- Murray JM. 1981. Control of cell shape by calcium in the Euglenophyceae. *J Cell Sci* **49**, 99–117.
- Peng C, Lee J.W, Sichani H.T, Ng J.C. 2015. Toxic effects of individual and combined effects of BTEX on *Euglena gracilis*. *Journal of hazardous materials*, **284**, 10-18.
- Pringsheim E.G, Hovasse R. 1948. The loss of chromatophores in *Euglena gracilis*. *New Phytologist*, **47**, 52-87.
- Rama EM, Bortolan S, Vieira ML, Gerardin DC, Moreira EG. 2014. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. *Regul Toxicol Pharmacol* **69**, 476–486.

- Rao J.V, Srikanth K, Arepalli S.K, Gunda V.G. 2006. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pesticide biochemistry and physiology*, **86**, 131-137.
- Reuzel P.G.J, Hendriksen C.F.M., Til H.P. 197). Long-term (two-year) toxicity study with carbendazim in beagle dogs. Central Institute for Nutrition and Food Research for BASF. Report, (R5023).
- Rico A, Sabater C, Castillo MA. 2016. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf* **127**, 222–229.
- Sakr S.A, Shalaby S.Y. 2012. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract. *Toxicol Ind Health* **30**, 259–267.
- Scott R, Ericson L.E. 1955. Some aspects of cobalt metabolism of *Rhodospira rubra* with particular reference to Vitamin B12 content. *J. Exp. Bot.* **6**,348-361.
- Selmanoglu G, Barlas N, Songür S, KocSkaya E.A. 2001. Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human & experimental toxicology*, **20**, 625-630.
- Sherman H, Culik R., Jackson R. A. 1975. Reproduction, teratogenic, and mutagenic studies with benomyl. *Toxicology and applied pharmacology*, **32**, 305-315.
- Sigee D.C. 2005. *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Silva AR, Cardoso DN, Cruz A, Lourenc\_o J, Mendo S, Soares AM, Loureiro S . 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* **115**, 279–290.
- Singh S, Singh N, Kumar V, Datt S, Wani A, Singh D, Singh K, Singh J, 2016. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environ Chem Lett* **14**, 317–329.
- Sitarek K. 2001. Embryo-lethal and teratogenic effects of carbendazim in rats. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, **21**, 335-340.
- Staub t, Sozzi d. 1984. Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant Disease* **68**, 1026-1031.
- Takenaka S, Kondo T, Nazeri S, Tamura Y, Tokunaga M, Tsuyama S, Miyatake K, Nakano Y. 1997. Accumulation of trehalose as a compatible solute under osmotic stress in *Euglena gracilis* Z. *J Eukaryot Microbiol* **44**, 609–613.

- Tannreuther G.W. 1923. Nutrition and reproduction in Euglena. Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen, **52**, 367-383.
- Vega A, Garrido Frenich A. Martinez Vidal J.L. 2005. Monitoring of pesticide sin agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Anal. Chim. Acta **538**, 117-127.
- WHO. 1986. Carbamate pesticides: a general introduction. Geneva, World Health Organisation (Environmental Health Criteria 64).
- WHO. 1990. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Geneva, World Health Organization.
- WHO. 1993a. Health and Safety Guide No. 8: Carbendazim Health and Safety Guide. Geneva, World Health Organisation.
- WHO. 1993b. Carbendazim. Genevea, World Health Organisation (Environmental Health Criteria 149).
- WHO/IPCS. 1993 . Carbendazim. Environ Health Criter Monogr, **149**, 1-17.
- Yenjerla M, Cox C, Wilson L, Jordan M.A. 2009. Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **328**, 390-398.

## **7. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 28. veljače 1991. godine u Zadru. Osnovnu školu i Opću gimnaziju završila sam u Benkovcu, nakon čega sam upisala preddiplomski studij Biologije i ekologije mora, Sveučilišni odjel za studije mora Sveučilišta u Splitu, čime sam stekla titulu prvostupnica biologije i ekologije mora. 2015. godine sam upisala diplomski studij Ekologija i zaštita prirode na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kao član udruge Sunce (udruga za prirodu, okoliš i održivi razvoj) imala sam priliku pohađati niz radionica i seminara. Izvan fakulteta radila sam preko studentskog centra, a na ljeto 2016. volontirala sam u Nacionalnom parku "Plitvička jezera" gdje sam imala priliku raditi na terenu, naučiti o upravljanju zaštićenim područjem, a kroz komunikaciju i edukaciju posjetitelja iz cijelog svijeta unaprijedila sam i vlastite komunikacijske vještine.