

Utjecaj pesticida imazalila na preživljenje i populacijsku dinamiku vrste *Euglena viridis*

Šašek, Ivana

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:318540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Šašek

**Utjecaj pesticida imazalila na preživljenje i populacijsku dinamiku vrste
*Euglena viridis***

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

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

ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru izv. prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na savjetima, znanju, posvećenom vremenu i iznimnoj pomoći pri izradi ovog rada kao i svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju koji su na bilo koji način pomogli prilikom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem svojim roditeljima na silnoj podršci, razumijevanju i logistici tijekom svih godina studiranja. Hvala mojim prijateljima što su bili uz mene, na njihovoj podršci i razumijevanju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ PESTICIDA IMAZALILA NA PREŽIVLJENJE I POPULACIJSKU DINAMIKU VRSTE *Euglena viridis*

Ivana Šašek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Primarna uloga pesticida je kontrola insekata, gljivica i drugih nametnika na poljoprivrednim kulturama, ali zbog njihovog nespecifičnog mehanizma djelovanja često negativno utječu na ne ciljane organizme. Jednostanični protista poput *Euglene viridis*, imaju važnu ulogu u prijenosu energije i hranjivih tvari unutar hranidbene mreže u vodenim ekosustavima, stoga je važno poznavati njihovu populacijsku strukturu kako bi se ekosustav održalo stabilnim. Istraživanjima je utvrđeno da imazalil ima neurotoksičan i teratogen učinak kod glodavaca, toksičan je za vodene beskrlešnjake i kralješnjake, ali nema konkretnih istraživanja na slatkovodnim jednostaničnim organizmima. Cilj ovog rada bio je simulacijom prirodnih uvjeta u laboratoriju istražiti potencijalan toksičan učinak pesticida imazalila na slatkovodne jednostanične organizme koristeći kao modelni organizam vrstu *E. viridis*. Istraživan je utjecaj pesticida na preživljenje i populacijsku dinamiku vrste, te biokemijske promjene koje se događaju unutar istraživanog organizma pri tretmanu različitim dozama pesticida. Određena je LC₅₀ koncentracija pesticida koja iznosi 180 µM. Pri niskim koncentracijama imazalila dolazi do promjena u kretanju stanica, 50% organizama u populaciji postaje nepokretno, a pri dozama višim od 500 µM imazalila dolazi do promjena u vijabilnosti stanica. Imazalil inhibira reakciju enzima MTS-a za 60%, ali ne utječe na aktivnost LDH enzima. Poremećaj metabolizma indirektno prati i promjena unutarstanične redoks ravnoteže biokemijskih reakcija. Unutar stanica pri dozi od 200 µM dolazi do intenzivnog stvaranja unutarstaničnog vodikovog peroksida što pokazuje povećana aktivnost enzima SOD.

(57 stranica, 27 slika, 12 tablica, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: imazalil;; euglena; toksičnost; populacijska dinamika

Voditelj: Dr.sc. Domagoj Đikić, izv.prof

Ocjenitelji: Dr.sc. Domagoj Đikić, izv.prof

Dr. sc. Sunčica Bosak, doc.

Dr. sc. Marko Miliša, izv. prof

Rad prihvaćen: 14. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

THE IMPACT OF THE PESTICIDE IMAZALIL ON THE SURVIVAL AND POPULATION DYNAMICS OF *Euglena viridis*

Ivana Šašek

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The primary role of pesticides is to control insects, fungi and other parasites on agricultural cultures, but because of their unspecific mechanism of action, they often negatively affect other organisms. Single celled protists such as *Euglena viridis*, play an important role in transfer of energy and nutrients within food webs of aquatic ecosystems, so it is important to know their population structure to keep the ecosystem stable. Studies have shown that imazalil has a neurotoxic and teratogenic effect on rodents, is toxic to aquatic invertebrates and vertebrates, but there is not any specific research on freshwater single celled organisms. The aim of this paper was to simulate the natural conditions in the laboratory to investigate the potential toxic effects of pesticide imazalil on freshwater organisms using the *E. viridis* as a model organism. The influence of pesticides on the survival and population dynamics of the species and the biochemical changes occurring within the investigated organism were studied in the treatment of different pesticide doses. LC₅₀ concentration of pesticides was measured as 180 µM. At low concentrations of the pesticide, changes in the cellular movement occur, 50% of the organisms in the population become immobile. At doses higher than 500 µM, changes in cell viability occur. Imazalil inhibits the MTS enzyme reaction by 60% but does not affect the activity of LDH enzyme. Metabolic disorders are indirectly monitored and follow the changes in the intracellular redox balance of biochemical reactions. Within cells at a dose of 200 µM, intense formation of intracellular hydrogen peroxide results in increased activity of the SOD enzyme.

(57 pages, 27 images, 12 tables, 63 citations, original language: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: imazalil;; euglena; toxicity; population dynamics

Supervisor: Dr. Domagoj Đikić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Domagoj Đikić, Assoc. Prof.

Dr. Sunčica Bosak, Assoc. Prof.

Dr. Marko Miliša, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 14. september 2017.

POPIS KRATICA

ADI	prihvatljiv dnevni unos (<i>eng. acceptable daily intake</i>)
ARfD	akutna referentna doza
BCF	faktor biokoncentracije (<i>eng. bioconcentration factor</i>)
CAT	enzim katalaza
CO ₂	ugljičkov dioksid
dH ₂ O	destilirana voda
DHE	dihidroksietidij
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (<i>eng. ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (<i>eng. Food and agricultural organization</i>)
H ₂ DCF	dihidrokloroflorescin
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HEPES	zwitterionski pufer (<i>eng. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>)
JMPR	zajednički FAO/WHO stručni odbor za rezidue pesticida (<i>eng. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues</i>)
INT	[2 (jod - fenil) - 3 (nitro - fenil) - 5 (feril) tetrazolijum klorid)]
LD ₅₀	letalna doza pri kojoj umire 50% populacije
LHD	laktat dehidrogenaza
MDA	malondialdehid
MDK	maksimalna dozvoljena koncentracija
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sulfofenil)- 2H-tetrazolijeva sol
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NH ₄ ⁺	amonijev ion
NOAEL/NOEC	koncentracija pri kojoj pesticid ne izaziva štetne učinke (<i>eng. no observed adverse effect level; no observed effect</i>)

	<i>concentration)</i>
NO_3^-	nitratni ion
O_2	molekularni kisik
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoksidni anion
OD	optička gustoća (<i>eng. optical density</i>)
PBS	fosfatni pufer (<i>eng. phosphate-buffered saline</i>)
PCS	sistem za kodiranje procedura (<i>eng. Procedure Coding System</i>)
PES	fenazin etosulfat (<i>eng. phenazine ethosulfate</i>)
PO_4^{3-}	fosfatni ion
PPM	milijunti dio (<i>eng. parts per million</i>)
ROS	slobodni kisikovi radikali (<i>eng. reactive oxygene species</i>)
RPM	jedinica za frekvenciju rotacije (<i>eng. revolutions per minute</i>)
SOD	superoksid dismutaza
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>eng. World Health Organization</i>)
XOD	ksantin oksidaza
ΔA	promjena apsorbancije

Sadržaj

1. LITERATURNI PREGLED	1
1. 1 Sistematika vrste <i>Euglena viridis</i>	1
1. 2 Biološka svojstva vrste <i>Euglena viridis</i>	2
1. 2. 1 Fiziologija vrste <i>Euglena viridis</i>	3
1. 2. 2 Životni ciklus	5
1. 3 <i>Euglena viridis</i> kao pokusni organizam u laboratorijskim uvjetima i ekotoksikološkim istraživanjima.....	6
1. 4 Utjecaj pesticida na populacije jednostaničnih eukariotskih organizama u prirodi (Ekotoksikološka istraživanja)	7
1. 5 Laboratorijska istraživanja utjecaja pesticida na jednostaničnim eukariotskim organizmima	7
1. 6 Imazalil	10
1. 6. 1 Kemijska struktura	10
1. 6. 2 Primjena i količine u okolišu	11
1. 6. 3 Toksikologija	13
1. 7. Cilj istraživanja.....	16
2. MATERIJALI I METODE	17
2. 1 Priprema starter kulture	17
2. 2 Praćenje populacijske dinamike vrste <i>Euglena viridis</i>	17
2. 3 Priprema radne otopine pesticida imazalila.....	19
2. 4 Određivanje letalne koncentracije 50 (LC ₅₀).....	20
2. 5 Određivanje razine oksidativnog stresa unutar populacije	22
2. 5. 1 LDH test.....	23
2. 5. 2 MTS test.....	24
2. 5. 3 Superoksid dismutaza (SOD).....	26
2. 5. 4 Dokazivanje slobodnih radikala u stanicama na fluorescencijskom mikroskopu..	27

3. REZULTATI.....	28
3. 1 Akutno izlaganje populacije <i>Euglena viridis</i> imazalilom, brojnost stanica i LC ₅₀	28
3. 2 Deskriptivan opis vijabilnosti populacije <i>Euglena viridis</i>	32
3. 3 Enzimska aktivnost.....	33
3. 3. 1 MTS test izloženosti vrste <i>Euglena viridis</i> pesticidu imazalilu.....	33
3. 3. 2 LDH test izloženosti vrste <i>Euglena viridis</i> pesticidu imazalilu.....	36
3. 3. 3 Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod vrste <i>Euglena viridis</i>	39
3. 3. 4 Brojnost vrste <i>Euglena viridis</i> u zatvorenoj laboratorijskoj populaciji i trovanja tijekom 18 dana izloženosti pesticidu imazalilu	41
3. 4 Fluorescencijsko-mikroskopska detekcija intracelularne razine slobodnih radikala superoksidnog aniona fluorescentnom bojom DHE i razine vodikovog peroksida bojom H ₂ DCF kod vrste <i>Euglena viridis</i> pri različitim koncentracijama pesticida imazalila tijekom 4 sata izloženosti.....	43
4. RASPRAVA.....	45
5. ZAKLJUČAK	49
6. LITERATURA.....	50
7. ŽIVOTOPIS	57

1. LITERATURNI PREGLED

1. 1 Sistematika vrste *Euglena viridis*

Pripadnici roda *Euglena* spadaju u euglenoide, jednostanične protiste koji imaju važnu ulogu u prijenosu energije i hranjivih tvari unutar hranidbene mreže u vodenim ekosustavima gdje zauzimaju prvu trofičku razinu, onu primarnih proizvođača.

Protisti su mikroskopski, većinom jednostanični organizmi koji imaju jezgru u kojoj se nalazi genski materijal odvojen membranom od citoplazme. Svi protisti se mogu razmnožavati nesporno bez izmjene genskog materijala, te spolno. Protiste možemo podijeliti na dvije velike skupine: heterotrofne i autotrofne protiste. Organizmi koji mogu obavljati fotosintezu spadaju u skupinu autotrofnih protista. Skupinu većinom čine jednostanične alge koje se prema obliku svojih stanica i fotosintetskom pigmentu mogu podijeliti u nekoliko skupina među kojima su Heterokontophyta, Dinoflagellata i Euglenoida. Heterotrofni protisti se hrane bakterijama, drugim protistima, mrtvom organskom tvari, a neki su paraziti i iskorištavaju resurse drugih organizama. Među heterotrofnim protistima se nalaze pripadnici Amoebozoa, Ciliata te Myxomycetes. U praktičnom smislu, mogu se podijeliti u tri glavne skupine ovisno o načinu kretanja: amebe, trepetiljkaši i bičaši (Enescuola, 2011).

Vrstu *Euglena viridis* prvi je opisao O. F. Müller 1674. u Nizozemskoj kao protista s algom koja ima očnu pjegu. Vrsta spada u domenu Eukaryota, carstvo Protista, nadcarstvo Eozoa, koljeno Euglenozoa, podkoljeno Euglenoida, razred Euglenophyceae, red Euglenales, porodicu Euglenaceae i rodu *Euglena* koji je prvi opisao Ehrenberg 1838. (Guiry i Guiry, 2017).

Razred Euglenophyceae obuhvaća autotrofne članove Euglenoida koji su često dio planktonske zajednice u morskim i slatkovodnim ekosustavima. Razred većinom čine autotrofni jednostanični bičaši s jednim do nekoliko plastida sekundarnog podrijetla s tri stanične membrane i klorofilom *a* i *b*. U razred su uključene i bezbojne vrste koje su izgubile sposobnost fotosintetiziranja, kao i fotoosjetilni aparat (Bicudo i Menezes, 2016).

Euglenoida, zajedno s Kinetoplastea (triplanosome), Diplonemea (rodovi *Diplonema* i *Rhynchopus*) i Symbiontida čine koljeno Euglenozoa koje karakteriziraju organizmi sa dva biča (Simpson, 1997; Roy i sur., 2007; Adl i sur., 2012). Euglenoida obuhvaća autotrofne, heterotrofne i miksotrofne vrste. Skupinu pretežno čine slobodnoživući organizmi koji ispod pelikule imaju tipične paralelne proteine i mikrotubule (Leander i sur., 2007; Yamaguchi i sur., 2012).

1. 2 Biološka svojstva vrste *Euglena viridis*

E. viridis (grčki, eu = istina; glene = očna jabučica; latinski, viridis = zelena) je česti slobodno živući slatkovodni bičaš. To je mikroskopski organizam, duljine od 40 do 60 mikrometara i širine od 14 do 20 mikrometara u svom najširem dijelu. Tijelo joj je izduženo, vretenastog oblika s prednjim tupim krajem i istaknutim stražnjim krajem (Slika 1.). Možemo ju pronaći u ribnjacima, bunarima, jarcima koji su bogati organskim tvarima, pogotovo dušikom koji potječe iz biljnih ostataka ili urina i fekalija životinja. U povoljnim se uvjetima vrlo brzo razmnožava, te može stvoriti zeleni sluzavi film na površini vode koji nalikuje cvjetanju algi (Shah, 2013).



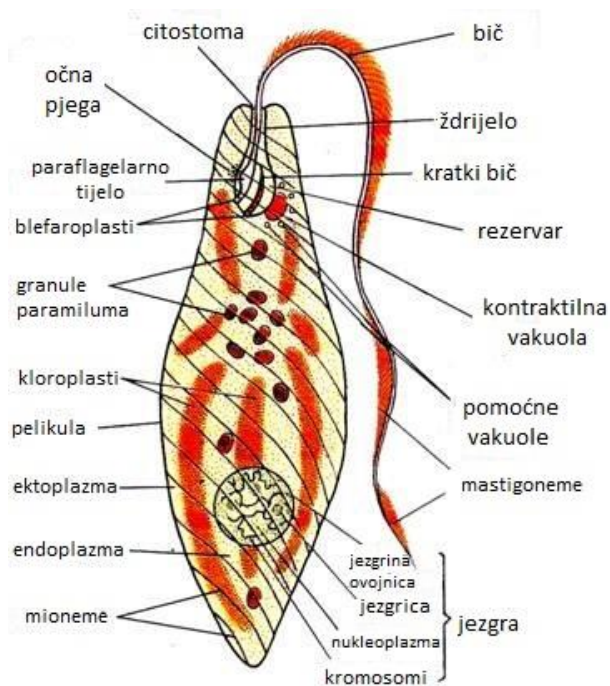
Slika 1. Fotografija vrste *Euglena viridis* snimljena pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 400x (preuzeto iz TheMicrobiology 09, 2011)

1. 2. 1 Fiziologija vrste *Euglena viridis*

Tijelo je prekriveno tankom, čvrstom i fleksibilnom pelikulom koja organizmu daje oblik. Na pelikuli se nalaze koso položene međusobno paralelne niti. Uz pelikulu na unutrašnjoj strani se nadovezuje citoplazma koja se dijeli na vanjsku ektoplazmu i unutarnju endoplazmu. Ektoplazma je tanka, negranulirana, u sol stanju, a endoplazma granulirana, vakuolizirana i u gel stanju. Na prednjem dijelu stanice nalaze se stanična usta ili citostoma koja vode u ždrijelo. Pomoću citostome i ždrijela se izbacuje tekućina iz spremnika. U blizini spremnika nalazi se kontraktilna vakuola. Pomoću kontraktilne vakuole regulira se količina vode u organizmu (Matonićkin, 1990).

Postoje dva biča koji proizlaze iz korijena spremnika, a svaki korijen izvire iz bazalnog tijela. Mali bič se ne proteže izvan spremnika i često prijanja uz veliki bič. U blizini spremnika nalazi se crvena očna pjega ili stigma koja je osjetljiva na svjetlost (Leander i sur., 2017).

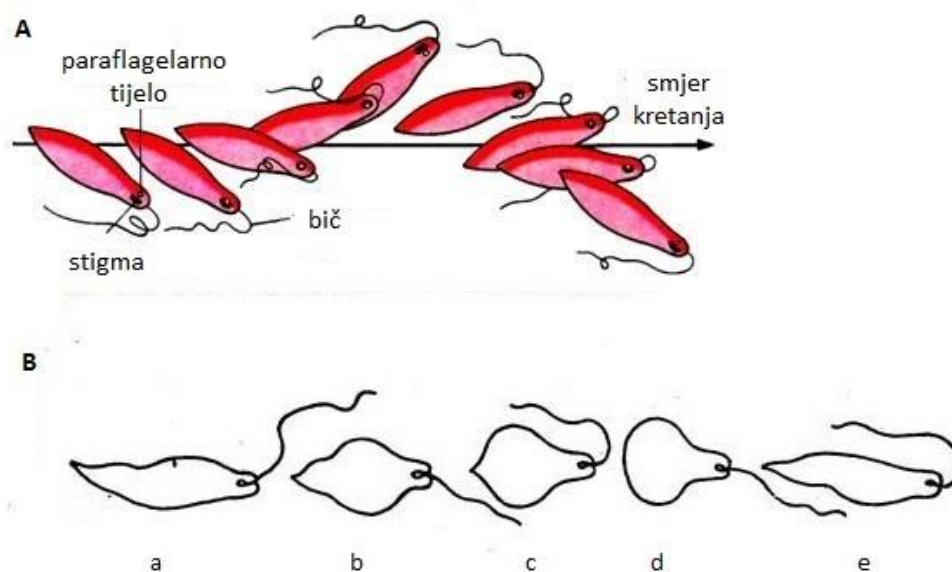
U sredini tijela smjestila se velika i okrugla jezgra oko koje se nalaze suspendirani u citoplazmi duguljasti plastidi koji sadrže zeleni pigment, klorofil *a* i *b*. Nazivaju se i kloroplastima, te sudjeluju u procesu fotosinteze. Kloroplasti su raspoređeni zrakasto poput zvijezda. Raspršene po endoplazmi nalaze se granule paramiluma u kojima se pohranjuje šećer paramilum koji je produkt fotosinteze (Slika 2.) (Kershaw, 1988).



Slika 2. Unutrašnja građa stanice *E. viridis* (preuzeto i prilagođeno iz Shah, 2013)

Euglena se pokreće na dva načina: pomoću biča i euglenoidnim kretanjem. Bič se ponaša poput propelera, gdje se spiralnom kretnjom biča organizam pokreće prema naprijed (Kaur, 2016). Energija potrebna za pokretanje biča se dobiva iz ATP-a (Slika 3. A) (Matoničkin, 1990).

Euglenoidno kretanje se odvija vrlo sporo, peristaltički val kontrakcije i ekspanzije širi se cijelim tijelom i organizam se pokreće prema naprijed. Ovakvo kretanje uzrokuju kontrakcije citoplazme ili niti koji se nalaze ispod pelikule (Slika 3. B) (Kershaw, 1988).



Slika 3. Kretanje kod *E. viridis*: A) pokretanje pomoću biča; B) euglenoidno kretanje (preuzeto i prilagođeno iz Jain, 2013; Shah, 2013)

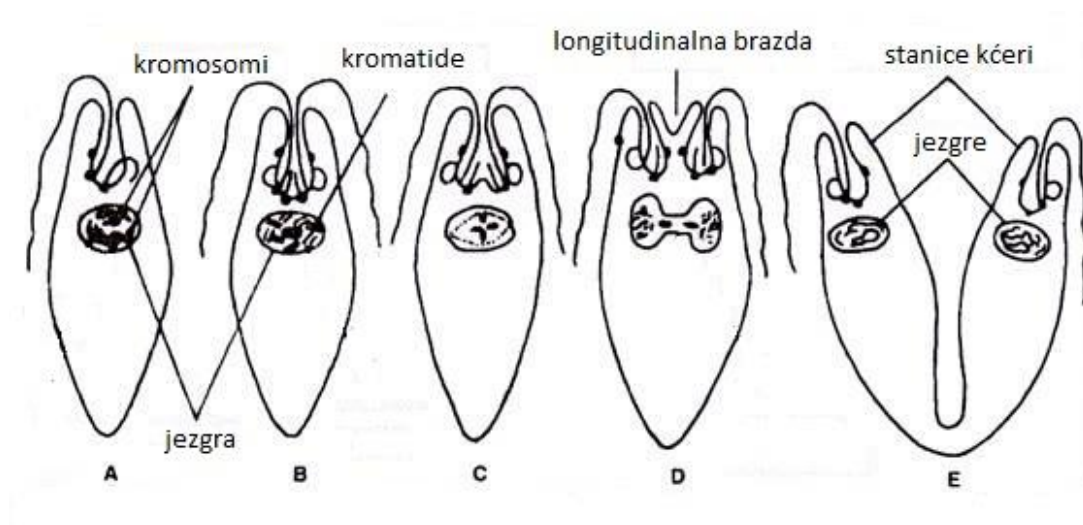
Prehrana vrste *E. viridis* je miksotrofna (autotrofna i heterotrofna). Procesom fotosinteze stvara ugljikohidrate iz ugljikovog dioksida i vode. Višak stvorenih ugljikohidrata se skladišti u granulama paramiluma koje sliče škrobu kod biljaka. Euglena se hrani autotrofno sve dok ima dovoljno svjetlosti, a njenim nedostatkom prelazi na heterotrofni način prehrane. U ovom načinu prehrane, euglena kroz površinu tijela apsorbira organske tvari iz vode koje su nastale raspadanjem biljnog materijala ili fekalijama životinja (Shah, 2013; Kaur, 2016).

Izmjena plinova odvija se difuzijom preko površine tijela, otopljeni kisik se apsorbira iz okolne vode, a difuzijom se otpušta ugljikov dioksid (Kershaw, 1988).

E. viridis odgovara na različite podražaje iz prirode, a naročito je osjetljiva na svjetlost. Njena fotosenzitivnost ovisi o intenzitetu svjetlosti, obično pliva prema izvoru svjetlosti. Očna pjega smatra se optičkim organom. Euglene izbjegavaju izravne sunčeve zrake i sjenoviti dio, te u kulturi biraju njima optimalni pojas svjetlosti (Shah, 2013).

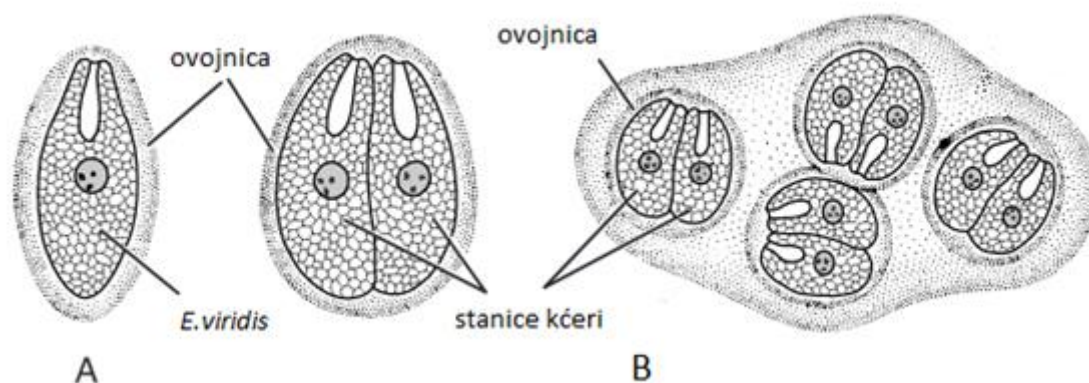
1. 2. 2 Životni ciklus

Tijekom aktivnog razdoblja i povoljnih životnih uvjeta, euglena se razmnožava nespolno binarnim uzdužnim dijeljenjem koje rezultira dvjema simetričnim jedinkama. Mitoza jezgre se odvija unutar jezgrine ovojnice. Organeli koji se nalaze u prednjem dijelu tijela (stigma, blefaroplasti, citofarinks, spremnik, kromatofori, zrna paramiluma) se dupliciraju, a tijelo se dijeli uzdužno od prednjeg prema stražnjem dijelu. Jedna od novonastalih stanica zadržava bič, a druga razvija novi. Kontraktilna vakuola i paraflagelarno tijelo se ne dijele, već svaka stanica razvija nove organele (Slika 4.) (Shah, 2013).



Slika 4. Binarno uzdužno dijeljenje *E. viridis* (preuzeto i prilagođeno iz Priyadarshini, 2013)

Tijekom nepovoljnih uvjeta, kao što su suša, ekstremna hladnoća i vrućina, nedostatak kisika i hrane, *E. viridis* prelazi u trajni stadij koji se naziva cista. Stanica gubi svoj bič, postaje neaktivna i oko sebe luči debelu okruglu ovojnicu. Tijekom ovog nepovoljnog razdoblja za organizam, moguća je mitoza jednom ili više puta. Kod višestrukog dijeljenja citoplazma i jezgra prolaze kroz ponavljani proces mitoze što može rezultirati sa 16 ili 32 stanice kćeri (Slika 5.). Kada ponovno nastupe povoljni uvjeti, organizam postaje aktivan i izlazi iz ciste slobodno plivajući u vodi (Shah, 2013).



Slika 5. Višestruko dijeljenje u stadiju ciste kod *E. viridis*: A) individualna stanica u stadiju ciste; B) dijeljenje unutar ciste (preuzeto i prilagođeno iz DiacriTech, 2009)

1. 3 *Euglena viridis* kao pokusni organizam u laboratorijskim uvjetima i ekotoksikološkim istraživanjima

Jednostanični eukariotski organizmi su dobri modelni organizmi u laboratorijskim istraživanjima zbog poznavanja fiziologije i biokemijskih procesa velikog broja vrsta, unutar samo jedne stanice nalaze se svi fiziološki mehanizmi i biološke funkcije, generacijsko vrijeme im je kraće od višestaničnih životinja, te u laboratorijskim uvjetima možemo dobiti veliki broj organizama u malom volumenu. *E. viridis* kao dio fitoplanktonske zajednice ima važnu ulogu u vodenom ekosustavu, te se u ekotoksikološkim istraživanjima istražuje njena funkcija u transformaciji i razgradnji organske tvari, ulozi raznih onečišćivača u tim procesima kao i u akumulaciji, biodegradaciji i putevima prijenosa onečišćivača kroz vodeni ekosustav (Dive i Persoone, 1984).

Posebno se istražuje njena uloga u razgradnji organskih tvari u otpadnim vodama, gdje se euglena pokazala kao važan organizam u biodegradacijskim testovima (Sriram i Seenivasan, 2012). Također, provedena su razna istraživanja utjecaja teških metala na bioraznolikost jednostaničnih eukariotskih organizama i algi u slatkovodnim ekosustavima, gdje se pokazalo da je *E. viridis* prisutna u onečišćenim ekosustavima kao i njena osjetljivost na kadmij i mogućnost bioakumulacije cinka (Tharavathy i Hosetti, 2014; Plachno i sur., 2015; Coleman i sur., 1971).

1. 4 Utjecaj pesticida na populacije jednostaničnih eukariotskih organizama u prirodi (Ekotoksikološka istraživanja)

Najviše ekotoksikoloških studija je napravljeno na populacijama jednostaničnih eukariotskih organizama koje žive u tlu. U poljoprivredi, rast biljaka i njihova populacijska dinamika ovise o organizmima koji žive u tlu, stoga je važno održati njihovu brojnost i raznolikost stabilnom. Pesticidi imaju negativne učinke na heterotrofne bičaaše (Ekelund i sur., 2000), mijenjaju sastav i brojnost zajednice već pri malim koncentracijama (MaCrae i Vinckx, 1973; Ekelund, 1999; Ekelund i sur., 1994). Primijećen je izravan toksičan efekt pesticida na populacijama u kojima dominiraju heterotrofni bičaaši, amebe i trepetiljkaši (Ekelund i sur., 2000). Insekticidi su se pokazali toksičnijim od herbicida, a fungicidi s različitim toksičnim učincima se ne smatraju kritičnim za populaciju, ali potrebna su daljnja terenska istraživanja utjecaja pesticida na populacije jednostaničnih organizama (Foissner, 1997).

1. 5 Laboratorijska istraživanja utjecaja pesticida na jednostaničnim eukariotskim organizmima

Najviše laboratorijskih istraživanja utjecaja pesticida je napravljeno na trepetiljkasima, i to na vrsti *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838). Pri izloženosti insekticidu dimetoatu dolazi do promjena u lokomotornom kretanju i normalnoj funkciji kontraktilne vakuole. Insekticid utječe na stopu rasta populacije značajno povećavajući generacijsko vrijeme, kao i određene fiziološke promjene pri pokretanju trepetiljki (Shubhamsingh i Tejashree, 2014). Uočeno je da je vrsta vrlo osjetljiva na insekticid monokrotofos gdje nakon kratkog vremena izloženosti dolazi do povećanja broja nekrotičnih stanica i promjenama u citoplazmi koje dovode do lize stanica. Promjene u makronukleusu su izravno utjecale na normalan rad kontraktilne vakuole, smanjenje fagocitoze i vidljive morfološke promjene stanica (Amanchi, 2010).

Istražujući citotoksičan efekt karbofurana na vrstu, uočene su deformacije makronukleusa-fragmentacija, vakuolizacija i degeneracija. Promjene u radu vakuole primijećene su kod primjene različitih doza karbofurana na organizam (Hussain i sur., 1971). Biološki insekticid Delfin® WG pokazuje potencijalni fiziološki i citotogenotoksični učinak na vrsti *P. caudatum*. U istraživanjima akutne toksičnosti insekticida, pri malim dozama dolazi do neznatne promjene u kretanju stanica, dok pri većim dozama stanice se sporo kreću sve dok ne postanu potpuno nepokretne (Amanchi i Hussain, 2008).

Primijećene su promjene u obliku i izgledu stanica gdje pri većim koncentracijama dolazi do skraćivanja uzdužne osi tijela i istjecanja sadržaja citoplazme. Također dolazi i do promjene u radu kontraktilne vakuole i makronuklearnih aberacija (Amanchi i Hussain, 2008). Sličan citogenotoksični učinak na vrstu ima i insekticid azadiraktin (Amanchi, 2010). Zajedničkom primjenom pesticida novalurona i diflubenzurona dolazi do promjene u generacijskom vremenu, inhibiciji rasta stanica u kulturi kao i poremećaju u metabolizmu disanja (Rachid i sur., 2009). Primjenom akutnih testova istražena je toksičnost diuronskih i karbofuranskih aktivnih sastojaka i njihovih komercijalnih produkata na vrstu. Čisti diuron i njegov komercijalni produkt pokazivali su sličnu toksičnost, ali je zato komercijalni karbofuran bio toksičniji od njegovog čistog oblika. Uočeno je smanjenje brojnosti populacije i biomase *P. caudatum* (Mansano i sur., 2016). Izlaganjem vrste *P. caudatum* većim koncentracijama insekticida acefata, dolazi do lize stanica i raspadanja stanične membrane. Promjene u kretanju stanica su primijećene pri malim dozama insekticida. Upotrebom subletalnih doza produžuje se generacijsko vrijeme vrste (Rao i sur., 2007).

Istraživanjem utjecaja fosforamidata na stopu rasta i metabolizam disanja vrste *Paramecium aurelia* (Ehrenberg, 1838), dobiveni rezultati su bili identični onima na vrsti *P. caudatum* (Houneida i sur., 2012).

Temeljem kemijske strukture pesticida, načinom ulaska u stanicu i učinka, organofosforni pesticidi su se pokazali otrovnijim od organokloriranih za vrstu cilijata *Colpidium campylum* (Stokes, 1886), te se smatra da je toksičan učinak organokloriranih spojeva na neki način povezan s njihovom kemijskom strukturom. Fungicidi su se pokazali toksičnim za cijelu skupinu organizama, a herbicidi nisu pokazali značajnu toksičnost u odnosu na ostale pesticide (Dive i sur., 1980). U istraživanju sinergističkog učinka teških metala i pesticida na rast vrste, otkriveno je da bakar stvara sinergistički učinak s pesticidima koji u svojoj strukturi sadrže karbamat i ditiokarbamat, te se njihovo zajedničko pojavljivanje smatra vrlo nepovoljnim za vodeni okoliš (Bonnemain i Dive, 1990).

Vrsta *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg, 1830) se nije pokazala osjetljivom na DDT, ali ovaj spoj može akumulirati i uspješno metabolizirati DDE i DDD u svojem organizmu. Vrsta se pokazala osjetljivom na druga dva insekticida, klorpirifos i fenitrotion koje nije mogla metabolizirati. Klorpirifos se više akumulirao u organizmu od fenitrotiona koji je izazvao snažan inhibični učinak na rast u kulturi mijenjajući oblik i veličinu organizama (Lal i sur., 1987). Vrsta je osjetljiva i na insekticide dieldrin i dimetoat gdje uzrokuje 81% i 84% inhibicije rasta unutar 2 dana (Kumar i sur., 1989).

Dimetoat je izazvao lizu stanica i oslobađanje sadržaja mukociste, a dieldrin zaokruživanje stanica. Permetrin nije pokazao nikakve morfološke promjene unutar vrste i smatra se najmanje toksičnim od proučavanih insekticida (Kumar i sur., 1989).

Utjecaj pesticida je slabo istraživao na amebama. Vrsta *Rosculus ithacus* (Hawes, 1963) pokazala se osjetljivom na 8 vrsta pesticida: malation, karbendazim, metomil, dimetoat, cipermetrin, dicuran, fenitrothion gdje ovi pesticidi inhibiraju rast populacije uzgojene u laboratoriju (Hikal i sur., 2015). Kolinesterazna aktivnost vrste *Dictyostelium discoideum* (Raper, 1935) se pokazala kao osjetljivi biomarker na neurotoksične pesticide u sedimentima riječnih tokova (Amaroli, 2011).

Od istraživanja na euglenama, utjecaj pesticida karbofurana i malationa je istraživao na vrsti *Euglena gracilis* (Klebs, 1892) gdje se pokazalo se da je karbofuran toksičniji od malationa jer već pri kratkoročnom izlaganju vrste izaziva promjene u kretanju i orijentaciji stanica, morfologiji i fotosintezi.

Inhibicijski učinci nastali tijekom kratkoročnog izlaganja vrste dvama pesticidima su bili puno jači od onih nastali dugoročnim izlaganjem (Azizullah i sur., 2011). Osim pesticida, i drugi kemijski spojevi su toksični za vrstu *E. gracilis*. S porastom koncentracije benzena, etilena, toluena i ksilena dolazi do morfoloških promjena, inhibicije rasta i smanjenja sadržaja klorofila unutar stanica. Za istraživanu vrstu najtoksičnijim spojem se pokazao ksilen, a najmanje toksična spoj je bio benzen (Peng i sur., 2015). Otkriveno je da grafenov oksid uzrokuje oksidativni stres unutar populacije *E. gracilis*. Toksični efekt spoja se očituje stvaranjem velikog broja reaktivnih kisikovih radikala u organizmu (Ahme i Rodrigues, 2013; Hu i sur., 2015). Deterdženti inhibiraju mogućnost reorijentacije i kretanja stanica pomoću biča (Mikolajczyk i Diehn, 1978). Vrsta *E. gracilis* pod osmotskim stresom nakuplja u svojim stanicama trehalozu koja se postupno razgrađuje nakon što se ukloni višak soli iz okolnog medija (Takenaka i sur., 1997).

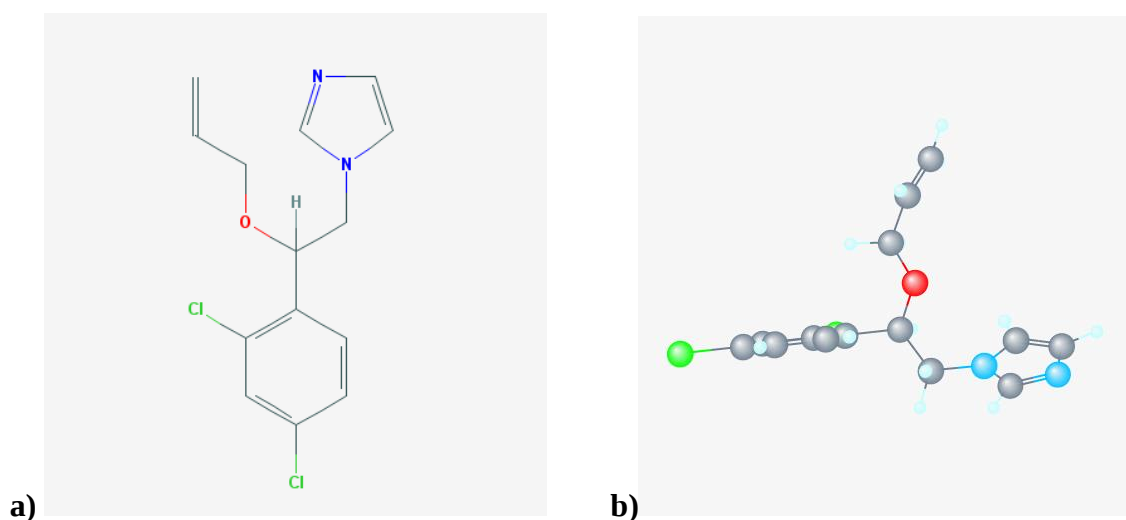
U pretraživanoj nama dostupnoj literaturi ne nalaze se podaci o toksikološkim ispitivanjima pesticida na vrsti *E. viridis*.

1. 6 Imazalil

Imazalil je poljoprivredni pesticid koji se najčešće koristi na biljkama iz roda *Citrus*. To je sustavni fungicid kojeg je 1983. godine registrirala tvrtka Janssen Pharmaceutica i od tada se primjenjuje na sjemenju i usjevu prije i nakon žetve (US EPA, 2005).

1. 6. 1 Kemijska struktura

Ovaj fungicid pripada skupini benzilnih alkohola i njihovih derivata jer sadrži fenilno-metanolnu podskupinu (Slika 6.). Poznat je i pod nazivima enilkonazol, kloramizol, Freshgard, fungaflor i nuzon. Kemijski naziv spoja je 1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-prop-2-enoksietil] imidazol, formule $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$ i molekularne mase $297,18 \text{ g mol}^{-1}$ (PubChem, 2005).



Slika 6. Kemijska struktura imazalila: a) 2D struktura; b) 3D struktura (Preuzeto iz PubChem, 2005)

Imazalil je emulzija blago žuto-smeđe boje koje ne izaziva hrđu. Temperatura vrelišta spoja je 347°C , a temperatura tališta 52.7°C . Gustoća spoja je $1,348 \text{ g/ml}$ pri 26°C . Topljivost spoja u acetonu, diklormetanu, etanolu, metanolu, izopropanolu, ksilenu, toulenu i benzenu iznosi $> 500\text{g/L}$ pri 20°C , a u heksanu 19 g/L pri 20°C . Spoj je također topiv u heptanu i eteru iz petroleja. Spoj je slabo topiv u vodi gdje njegova topljivost iznosi $0,18 \text{ g/L}$ pri pH 7,6 i 20°C (PubChem,2005).

1. 6. 2 Primjena i količine u okolišu

Imazalil se koristi za kontrolu širokog spektra gljivica na voću i povrću, sjemenju i kao tretman za održavanje svježine agruma, banana i ostalog voća tijekom njihovog skladištenja (Exttoxnet, 1996). Ovaj fungicid djeluje na propusnost stanične membrane patogenih gljiva, te pripada skupini fungicida inhibitora demetiliranja. Ovi enzimi inhibiraju citokrom P450 čija je funkcija demetilacija prekursora ergosterola koji je jedan od građevnih jedinica stanične membrane gljivica (FAO, 2001). Primjenjuje se i u veterini kao antimikotik s širokim spektrom djelovanja protiv dermatofita (*Microsporum* sp., *Trichophyton* sp.) i protiv vrsta *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., kao i kvasaca (npr. *Candida* sp.). Spoj ne djeluje na vrsti *Escherichia coli* i vrstama iz roda *Pseudomonas*, iako postoji baktericidna aktivnost spoja (EMEA, 1998).

Malo je podataka o količinama imazalila prisutnih u okolišu. Spoj je izrazito perzistentan u tlu jer se veže za soli prisutne u njemu, te njegovo prosječno vrijeme poluraspada iznosi između 120 i 190 dana (Exttoxnet, 1996). U pokusu u kojem se unutar vremenskih razdoblja od 14 dana zemljišna parcela tretirala sedam puta sa imazalilom, njegovi ostatci u sloju od 0 do 10 cm su iznosili 0,085 - 0,14 mg/kg (Exttoxnet, 1993). Također, u Kostarici, u uzorcima sedimenta iz bazena rijeke Suerte koji su uzorkovani u razdoblju od 1993-1997 detektirane su koncentracije od 175-960 µg/kg (Castillo i sur., 2000).

Izlijevanje ovog pesticida u vodene ekosustave predstavlja veliki ekološki problem. Spoj je prisutan u većim količinama u dijelovima svijeta koji se bave uzgojem citrusa i tropskog voća. Tako je imazalil detektiran u 64 od 97 uzoraka prikupljenih iz potoka u regiji Kostarike gdje se nalaze plantaže banana u koncentraciji 1-90 µg/L (Castillo i sur., 2000). Imazalil je stabilan najmanje osam tjedana na 4°C u kiselim i neutralnim vodenim otopinama, a vrijeme njegovog poluživota iznosi oko 6,5 mjeseci. Raspadanje ovog spoja potiču svjetlost i povišena temperatura (Exttoxnet, 1996).

Ipak najveće količine pesticida dolaze u okoliš prilikom njegove primjene u poljoprivredi. U istraživanjima provedenim na ječmu, nakon žetve posijano je sjeme koje je bilo tretirano imazalilom i nakon tjedan dana detektirano je oko 76% spoja u okolnom tlu i oko 29% u endospermu. Nakon tri tjedna istraživanja oko 6% spoja nalazilo se i u zelenim dijelovima biljke. U normalnim uvjetima skladištenja, naranče koje su umočene u 2 mg aktivnog sastojka po litri imaju 89% prisutnih ostataka spoja (Exttoxnet, 1996).

U istraživanju koje je provela Hrvatska agencija za hranu 2012. godine u narančama podrijetlom iz Južnoafričke Republike i Španjolske koje se nalaze na našem tržištu, zabilježene su doze koje su veće od maksimalno dozvoljenih koncentracija pesticida u hrani (Tablica 1.) (Miloš, 2014).

Tablica 1. Zabilježene i referentne vrijednosti dopuštenih koncentracija pesticida i akutne referentne doze (ARfD) prema Pravilniku o maksimalnim razinama ostataka pesticida u i na hrani i hrani biljnog i životinjskog podrijetla (Preuzeto iz Miloš, 2014)

Kombinacija pesticid/proizvod		Ostaci iznad MDK (mg/kg)	MDK (mg/kg)	ARfD	% ARfD	
Djelatna tvar	Vrsta i podrijetlo hrane				Odrasli	Djeca
imazalil	naranče (JAR)	27,9	5	0,1	713,9 1427,8	3700,1
	naranče (Španjolska)	9,98	5	0,05 (trudnice)	255,4 510,7	1323,6
	naranče (JAR)	8,0	5		204,7 409,4	1061
	naranče (JAR)	6,26	5		106,2 320,4	830

Prema američkim federalnim regulativama određene su tolerantne koncentracije imazalila i njegovih metabolita u prehrambenim proizvodima (Tablica 2.)

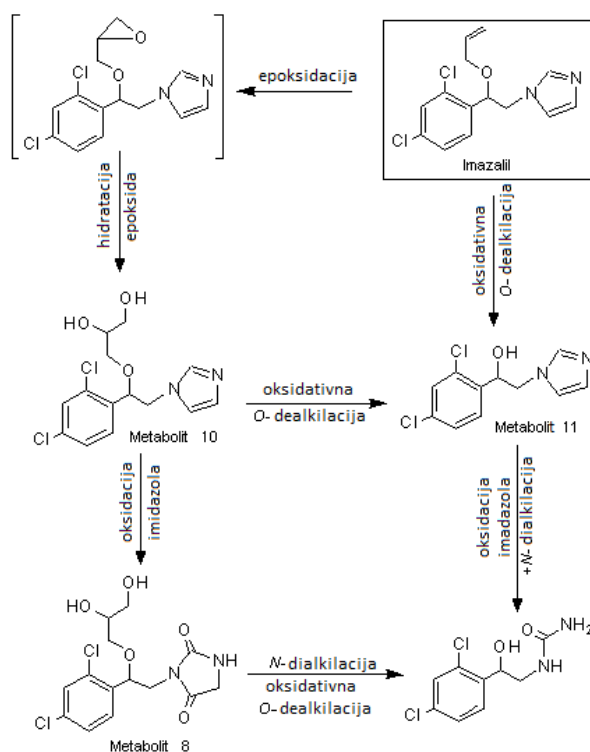
Tablica 2. Dozvoljene količine pesticida i njegovih metabolita u prehrambenim namirnicama (Preuzeto i prilagođeno iz PubChem, 2005)

NAMIRNICE	PPM
banana (cijela)	3,0
banana (pulpa)	0,20
ječam (zrno)	0,05
ječam (slama)	0,5
citrus (sok)	25,0
citrus (osušena pulpa)	25,0
voće, citrusi (poslije žetve)	10
pšenica (stočna hrana)	0,5
pšenica (zrno)	0,05
pšenica (slama)	0,5

1. 6. 3 Toksikologija

Prema WHO/PCS klasifikaciji ovaj fungicid klasificiran je kao „umjereno opasan“. Zajednički FAO/WHO stručni odbor za rezidue pesticida (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues – JMPR) donio je 1991. odluku o prihvatljivom dnevnom unosu (ADI) ovog pesticida u koncentraciji od 0 do 0,03 mg/kg tjelesne težine po danu koji je i Europska unija (EU) prihvatila. Prema regulativi EU koncentracija pri kojoj ovaj pesticid ne izaziva štetne učinke (NOAEL) iznosi 0 – 0,05 mg/kg tjelesne težine po danu.

Imazalil se ne bioakumulira u organizmu, već se brzo izlučuje kroz urin i fekalije. Tijekom biotransformacije spoj metabolizira u najmanje 25 metabolita. U istraživanju sa štakorima oba spola identificirana su tri glavna metabolita: ($\pm$)-1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-(2,3-dihidroksipropiloksi)etil]-imidaoksilidin-2,5-dion (Slika 7. Metabolit 8); ($\pm$)-1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-(2,3-dihidroksipropiloksi)etil]-1H-imidazol (Slika 7. Metabolit 10); ($\pm$)-1-(2,4-diklorofenil)-2-imidazol-1-iletanol (Slika 7. Metabolit 11). Glavne reakcije biotransformacije uključuju epoksidaciju, hidrataciju epoksida, oksidativno O-dealkiliranje i N-dealkiliranje. (Slika 6.) Nakon oralne i intravenozne primjene kod životinja oba spola primijećen je sličan metabolički uzorak (Mannens i sur., 1993).



Slika 7. Biotransformacija imazalila kod štakora (Preuzeto i prilagođeno iz Mannens i sur., 1993)

Imazalil se smatra štetnim ako se unosi oralnim putem i inhalacijom. Spoj ne nadražuje kožu, nije senzibilizator, te je njegova perkutana toksičnost niska, ali jako nadražuje oči. Prilikom oralnog izlaganja, najveći učinci su vidljivi u jetri gdje su moguća razna oštećenja. Imazalil se ne smatra genotoksičnim i degenerativnim, nije otkriven relevantni kancerogeni potencijal za čovjeka kao ni dokazi o njegovoj teratogenosti. Potrebna su daljnja istraživanja na ovom području (FAO, 2001).

Međutim, ovaj spoj se smatra štetnim za okoliš, posebno za vodene ekosustave u kojima može ostaviti dugotrajne posljedice. Stoga su provedena razna ekotoksikološka istraživanja na beskralješnjacima i kralješnjacima (Tablica 3.).

Tablica 3. Ekotoksikološki profil imazalila s navedenim testovima toksičnosti i ustanovljenim letalnim dozama (LD), efektivnim koncentracijama (EC), faktorom biokoncentracije (BCF), očekivanim stopama fekunditeta, mortaliteta i parazitizma (E), koncentracijama kod kojih nema primijećenih efekata (NOEC, NOAEL) na pojedinim istraživanim organizmima (Preuzeto i prilagođeno prema FAO, 2001)

VRSTA	TEST	REZULTAT
ženke štakora	akutna toksičnost	LD ₅₀ =227 mg as/kg tjelesne mase
Japanska prepelica	akutna toksičnost, jedna doza	LD ₅₀ =510 mg as/kg tjelesne mase
Divlja patka	kontrolirana prehrana unutar 5 dana	LD ₅₀ = >5620 mg/kg hrane
Divlja patka	reproduktivna toksičnost, istraživanje kroz 22 tjedna	NOEC=250 mg/kg hrane
ženke štakora	kratkotrajna oralna toksičnost	NOAEL=11,3 mg/kg tjelesne težine/danu
Kalifornijska pastrva	akutna toksičnost unutar 96h	LC ₅₀ =1,48 mg/L
Kalifornijska pastrva	bioakumulacija	BCF=48,7 to 63,8
<i>Daphnia magna</i>	akutna toksičnost unutar 48h	EC ₅₀ =3,5 mg/L
alge (vrsta nije definirana)	akutna toksičnost	EC ₅₀ =0,87 mg/L
<i>Chironomus</i> (organizam koji živi u sedimentu)	kronična toksičnost	NOEC=165,4 mg/kg sedimenta
Medonosna pčela	akutna oralna toksičnost	LD ₅₀ =35,1 µg/pčeli kroz 48 h
Medonosna pčela	akutna toksičnost prilikom kontakta s otrovom	LD ₅₀ =39 µg/pčeli kroz 48 h
rod <i>Coccinella</i> (Arthropoda)	prirodna izloženost kroz 14 dana	E (mortalitet) = 0% pri 66 g/ha
<i>Coccinella septempunctata</i>	14 dana reprodukcije	E (fekunditet)= 24,4% pri 66g /ha
<i>Poecilus cupreus</i> (Arthropoda)	prirodna izloženost kroz 14 dana	E (mortalitet)= 0% pri 88 g/ha
<i>Encarsia formosa</i>	7 dana u vodi	E (mortalitet) = 0% pri 30 g /100 L
<i>Encarsia formosa</i>	7 dana u vodi	E (parazitizam)= 0% pri 30 g/100 L
Lumbricina (<i>Eisenia foetida</i>)	akutna toksičnost	LC ₅₀ =541 mg/kg soli
<i>Eisenia foetida</i>	reproduktivna toksičnost	nije relevantna
mikroorganizmi tla, mineralizacija dušika		nema efekta pri 1 mg/kg soli
mikroorganizmi tla, mineralizacija ugljika		nema efekta pri 1 mg/kg soli

1. 7. Cilj istraživanja

U literaturnom pregledu i nama dostupnoj i pretraživanoj literaturi ne nalaze se podaci o toksikološkim ispitivanjima pesticida na vrsti *E. viridis*. Stoga je cilj ovog diplomskog rada istražiti potencijalan toksičan učinak pesticida imazalila na slatkovodne jednostanične organizme koristeći kao modelni organizam vrstu *E. viridis*, odrediti utjecaj pesticida na preživljenje i populacijsku dinamiku vrste, te biokemijske promjene koje se događaju unutar istraživanog organizma pri tretmanu različitim dozama pesticida.

2. MATERIJALI I METODE

2. 1 Priprema starter kulture

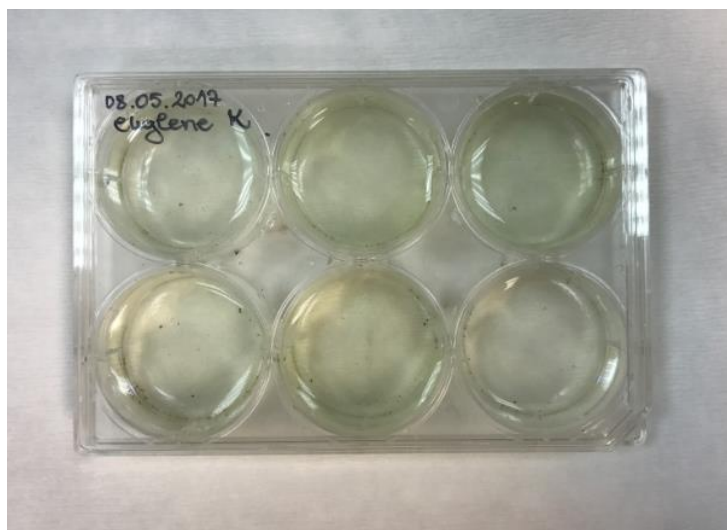
Starter kultura euglena održavala se prema protokolima uzgoja u autoklaviranim posudama u kojima se na dno položila kompostna zemlja prekrivena debelim slojem kalcijevog karbonata i prelivena destiliranom vodom (Slika 8.). Prije nasađivanja starter kulture, euglene od 10 ml sa ukupnim brojem stanica od 1×10^6 /mL dodale su se u opisanu autoklaviranu posudu i ona se zatvorila kako bi se uspostavila zatvorena zajednica euglena koja zbog mogućnosti fotosinteze uspostavlja životnu zajednicu bez drugih vodenih mikroorganizama. Metodologija uzgoja euglena preuzeta je iz Miliša i sur. 2017.



Slika 8. Starter kultura euglena u autoklaviranoj posudi

2. 2 Praćenje populacijske dinamike vrste *Euglena viridis*

Iz prethodno opisane starter-kulture euglena, za provedbu pokusa, čistu kulturu vrste *E. viridis*, prethodno uzgojenu u laboratoriju nasadila sam u volumenu od 1mL na pločicu sa 6 bunarića te dodala 9 mL nefiltrirane akvarijske vode kako bih oponašala prirodne uvjete koji prevladavaju u slatkovodnom okolišu (Slika 9.).



Slika 9. Pločica s 6 bunarića kontrolne skupine

Za određivanje populacijske dinamike pratila sam brojnost populacije u vremenskom razdoblju od 18 dana, brojeći stanice pod svjetlosnim mikroskopom svaka dva dana pomoću Bürker-Türk-ove komorice (Slika 10.). Pipetirala sam 10 μL resuspendirane otopine iz bunarića i pomiješala sa 10 μL 4% formalina kako bih zaustavila kretanje stanica po stakalcu. Od tako pripremljene otopine za brojanje, pipetirala sam 10 μL na stakalce. Brojala sam stanice koje su se nalazile unutar polja kvadrata i koje su dirale gornju i lijevu stranicu kvadrata. Broj stanica unutar 1 mL uzorka određen je računom:

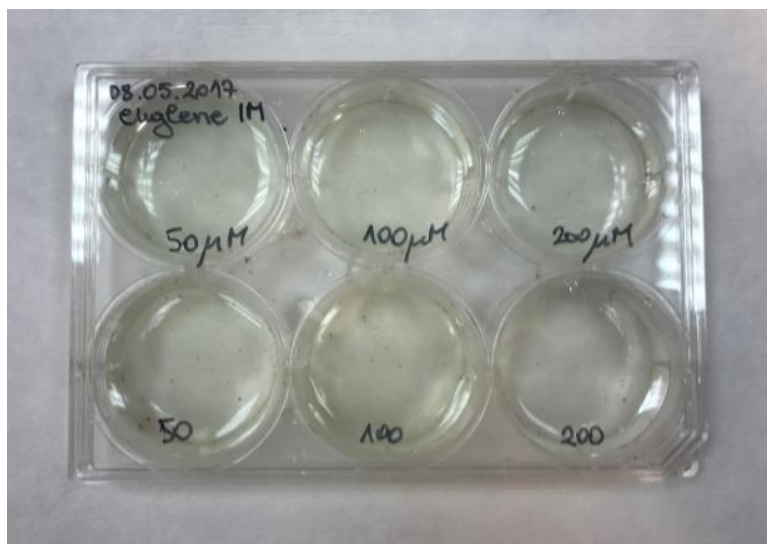
$$L = X / 16 \times 1/V \times \text{razrjeđenje} \times 1000 \text{ (mL)}$$

L- broj stanica; X- srednji broj stanica u kvadratu unutar komorice; V – volumen komorice.



Slika 10. Bürker-Türk komorica

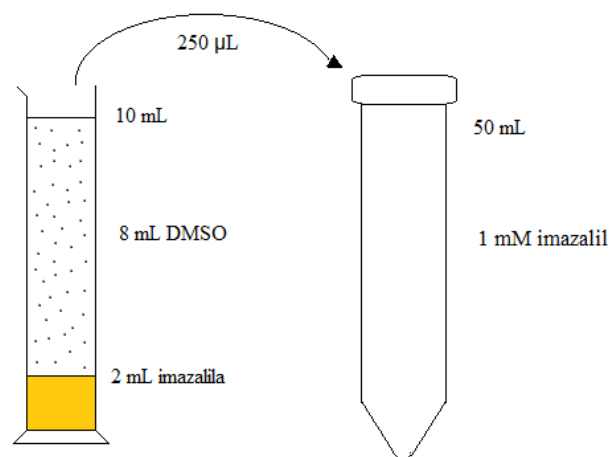
Pratila sam i populacijsku dinamiku populacije koja je tretirana s tri doze pesticida: 50, 100 i 200 μM . Unutar 1 mL pripremila sam iz radne otopine pesticida 50, 100 i 200 μM otopinu s kojom sam tretirala čistu kulturu euglena, te sam svaku koncentraciju stavila u 2 bunarića na pločicu sa 6 bunarića i dodala u svaki bunarić 9 mL akvarijske vode (Slika 11.). Brojnost populacije sam pratila na već prethodno opisani način u vremenskom razdoblju od 18 dana.



Slika 11. Pločica sa 6 bunarića euglena tretiranih sa 50, 100 i 200 μM dozama imazalila

2. 3 Priprema radne otopine pesticida imazalila

Originalni pesticid kupljen u tvornici Chromos d.o.o., Zagreb je 99,99%. Za potrebe pokusa pripremila sam 1mM otopinu pesticida. Pošto je pesticid vrlo viskozna tekućina žute boje i slabo se otapa u vodi, 2 mL imazalila otopila sam u 8 mL dimetil sulfoksida (DMSO) miješajući staklenim štapićem kako bi se pesticid dobro otopio. Iz 10 mL pripremljene otopine, u kojoj je imazalil razrijeđen 5 puta, pipetirala sam 250 μL u Falcon epruvetu od 50 mL i ulila destiliranu vodu do 50 mL kako bih dobila 1 mM otopinu pesticida koja je bezbojna tekućina (Slika 12.).



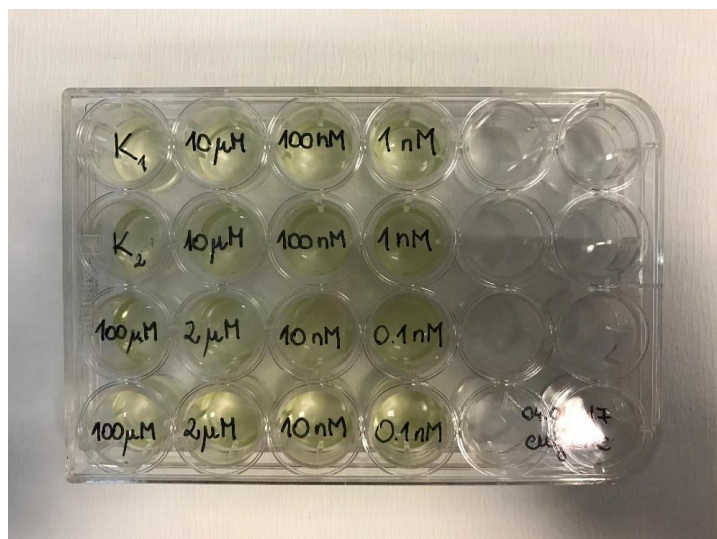
Slika 12. Priprema 1 mM otopine pesticida

2. 4 Određivanje letalne koncentracije 50 (LC₅₀)

Za određivanje letalne koncentracije 50 (LD₅₀) tretirala sam čisto uzgojenu populaciju vrste *E. viridis* različitim dozama pesticida imazalila, u rasponu koncentracija od 0,1 nM do 750 µM, tijekom 24 h tretmana. Iz pripremljene 1 mM radne otopine pesticida pripremljena su razrjeđenja od 1 mL prema Tablici 4. Razrjeđenja su pripremljena na pločici sa 24 bunarića, gdje su napravljene dvije replike svakog razrjeđenja (Slika 13).

Tablica 4. Priprema različitih koncentracija pesticida iz 1mM radne otopine unutar volumena od 1 mL

KONCENTRACIJA	VOLUMEN (1 mL)
kontrola	1 mL čiste kulture euglena
0,1 nM	10 µL radne otopine 3 + 990 µL euglena
1 nM	100 µL radne otopine 3 + 900 µL euglena
10 nM (radna otopina 3)	5 µL radne topine 2 + 995 µL euglena
100 nM	50 µL radne otopine 2 + 950 µL euglena
2 µM (radna otopina 2)	2 µL radne otopine + 998 µL euglena
10 µM	10 µL radne otopine + 990 µL euglena
50 µM	50 µL radne otopine + 950 µL euglena
100 µM	100 µL radne otopine + 900 µL euglena
200 µM	200 µL radne otopine + 800 µL euglena
250 µM	250 µL radne otopine + 750 µL euglena
300 µM	300 µL radne otopine + 700 µL euglena
350 µM	350 µL radne otopine + 650 µL euglena
400 µM	400 µL radne otopine + 600 µL euglena
450 µM	450 µL radne otopine + 550 µL euglena
500 µM	500 µL radne otopine + 500 µL euglena
550 µM	550 µL radne otopine + 450 µL euglena
600 µM	600 µL radne otopine + 400 µL euglena
650 µM	650 µL radne otopine + 350 µL euglena
700 µM	700 µL radne otopine + 300 µL euglena
750 µM	750 µL radne otopine + 250 µL euglena



Slika 13. Pločica s 24 bunarića sa euglenama tretiranim različitim dozama pesticida

Na svjetlosnom mikroskopu određivala sam brojnost populacije prije i nakon tretmana, te pokretljivost i oblik stanica unutar populacije 15 min nakon tretmana. Pokretljivost sam određivala kao normalnu, slabu i nepokretnost stanica, a oblik stanica kao oblik mrtvih, smežuranih i živih stanica. Nakon završenog 24h tretmana, sve uzorke sam pipetirala u Falcon epruvete od 14 mL i centrifugirala 30 min na 15 000 rpm.

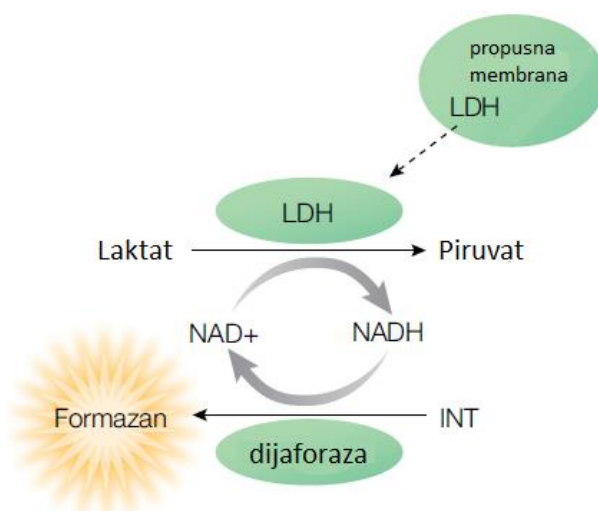
Nakon završene centrifuge, odlila sam supernatant iz svake epruvete i pospremila uzorke u hladnjak na - 80°C za potrebe daljnjeg istraživanja.

2. 5 Određivanje razine oksidativnog stresa unutar populacije

Razinu oksidativnog stresa unutar populacije odredila sam pomoću testova : LDH (laktat dehidrogenaza), MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) i SOD (superoksid dismutaza).

2. 5. 1 LDH test

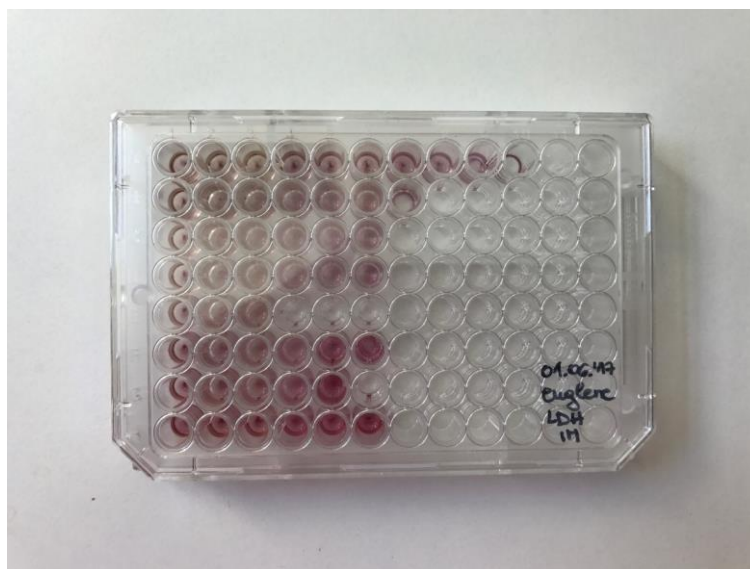
Prisutnu količinu laktat dehidrogenaze mjerila sam pomoću Promeginog kita CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay. Ovaj kit kvantitativno mjeri količinu enzima koji se oslobađa uslijed lize stanica. Oslobođeni enzim je prisutan u citoplazmi otprilike 9 h, te se mjeri u kulturi pomoću 30 minutnog enzimskog testa. Rezultat testa je promjena tetrazolijeve soli ([2 (jod - fenil) - 3 (nitro - fenil) - 5 (feril) tetrazolijum klorid)], INT) uz stvaranje crveno obojanog produkta (INT – formazan) (Slika 14.). Količina dobivenog obojenja proporcionalna je broju liziranih stanica (Promega, 2016).



Slika 14. Dobivanje obojenog produkta formazana pomoću oslobođenog LDH iz oštećenih stanica uz laktat, NAD⁺ i INT kao supstrate u prisutnosti enzima dijaforaze (Preuzeto i prilagođeno iz Promega, 2016)

Uzorci koji su bili podvrgnuti testu su prethodno homogenizirani. Smrznute uzorke iz prethodnog pokusa izvadila sam iz frižidera i stavila na led, a zatim u svaku Ependorf epruvetu uzorka dodala sam 300 µL pufera koji se sastoji od 50 mM PBS-a (fosfatni pufer) i 0,1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Svaki uzorak je homogeniziran otprilike 45 sekundi pomoću ultrazvučne sonde, a zatim centrifugiran 15 min na 15 000 rpm-a. Nakon završene centrifuge, supernatant je ispipetiran u nove označene epruvete.

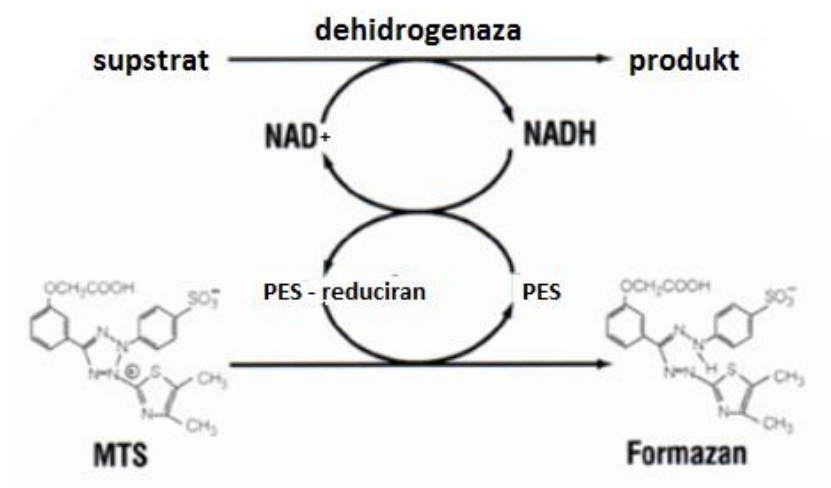
Svi potrebni reagensi za test su pripremljeni prema protokolu proizvođača. Na pločicu sa 96 bunarića stavila sam 50 μ L uzorka i 50 μ L reagensa, gdje je svaki uzorak imao svoj triplikat (Slika 15.). Pločicu sam omotala aluminijskom folijom i inkubirala ju 45 min na sobnoj temperaturi na miješalici uz lagano miješanje. Rezultate sam očitala nakon 9h inkubacije na spektrofotometru mjereći valnu duljinu na 490 nm.



Slika 15. Pločica s 96 bunarića nakon inkubacije uzoraka sa reagensom

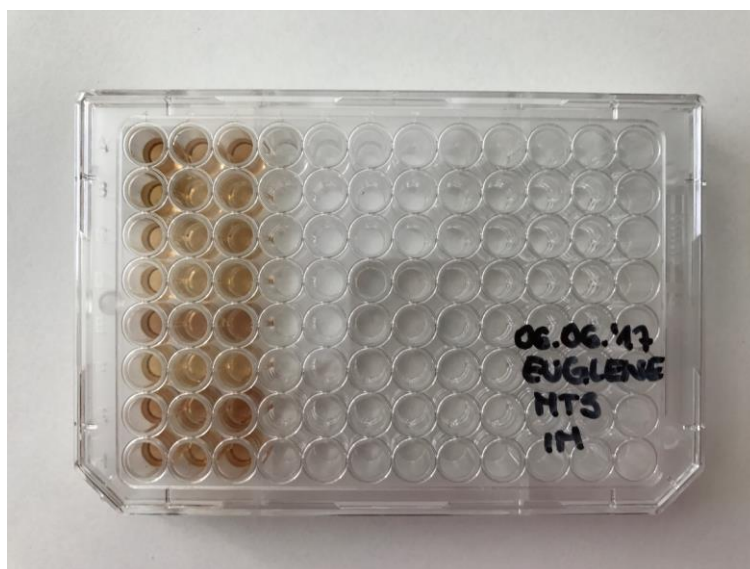
2. 5. 2 MTS test

MTS test je kolorimetrijska metoda pomoću koje se određuje broj živih stanica u testovima citotoksičnosti ili stanične proliferacije. Kit proizvođača Promega CellTiter 96® AQueous One Solution sadrži reagens koji u svom sastavu sadrži tetrazolijev spoj [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolijeva sol; MTS] i reagens za prijenos elektrona (fenazin etosulfat, PES) koji održava kemijsku ravnotežu i omogućuje da se formira stabilan spoj pri povezivanju s MTS-om. U normalnim prirodnim uvjetima stanice reduciraju tetrazolijev spoj (Owenov reagens) u obojani formazanski produkt koji je topiv u staničnim medijima. Ova reakcija se odvija u prisutnosti NADPH ili NADH koju proizvode enzimi dehidrogenaze u metabolički aktivnim stanicama (Slika 16.) (Promega 2012).



Slika 16. Redukcija MTS-a u formazan (Preuzeto i prilagođeno iz Promega, 2003)

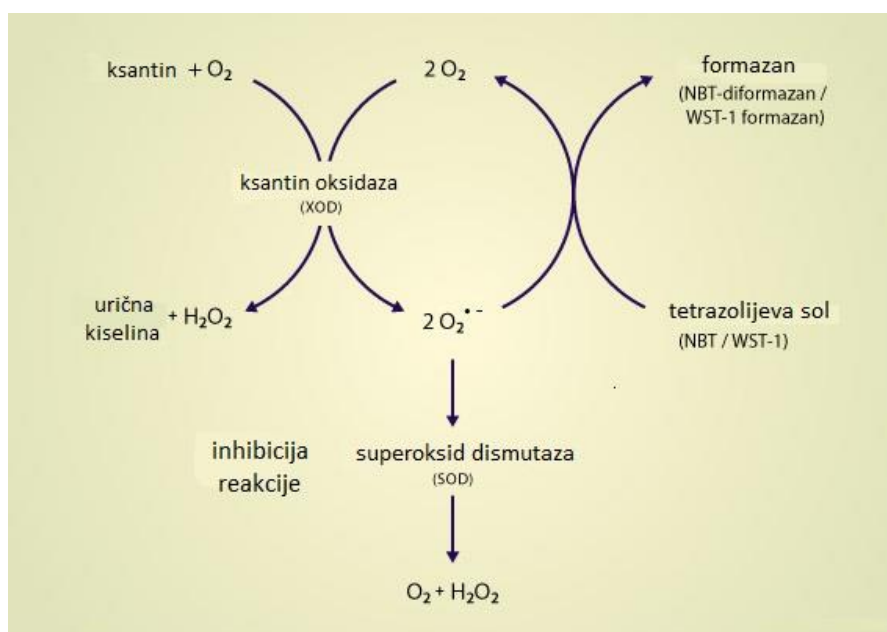
Na pločicu sa 96 bunarića stavila sam 100 μ L homogeniziranog uzorka i 20 μ L reagensa koji je bio pripremljen prema uputama proizvođača, gdje je svaki uzorak imao svoj triplikat (Slika 17.). Pločicu sam omotala aluminijskom folijom i inkubirala ju 45 min na sobnoj temperaturi na miješalici uz lagano miješanje. Rezultate sam očitala na spektrofotometru mjereći valnu duljinu na 490 nm.



Slika 17. Pločica s 96 bunarića nakon inkubacije uzoraka s reagensom

2. 5. 3 Superoksid dismutaza (SOD)

Jedan od najvažniji oksidativnih enzima-superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim koji katalizira dismutaciju superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$) u vodikov peroksid (H_2O_2) i molekularni kisik (O_2). Razvijene su mnoge direktne i indirektne metode određivanja aktivnosti SOD-a, a najčešće korištena je indirektna metoda koja koristi tetrazolijevu sol. U ovoj metodi, pretvorbom ksantina i kisika pomoću enzima ksantin oksidaze u uričnu kiselinu i vodikov peroksid nastaju superoksidni ioni. Nastali superoksidni anion pretvara tetrazolijevu sol ili citokrom c u obojani formazanski produkt. Dodatkom SOD-a u reakciju smanjuje se količina prisutnih slobodnih iona, pri čemu se također smanjuje i stopa nastanka obojanog produkta. Stopa aktivnosti SOD-a u eksperimentalnim uvjetima određuje se kao postotak inhibicije brzine stvaranja formazanskog produkta (Slika 18.) (R&D Systems, 2017).



Slika 18. Mehanizma djelovanja ksantin oksidaze, superoksid dismutaze i formiranja obojenog formazanskog produkta (Preuzeto i prilagođeno iz R&D Systems, 2017)

Za potrebe istraživanja pripremila sam 0,05 mM otopinu citokroma c na način da sam 28,97 mg citokroma otopila u 190 mL pufera za SOD. Pufer za SOD sam pripremila na način da sam pomiješala 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA. Zatim sam pripremila 1 mM otopinu ksantina tako da sam 3 mg ksantina otopila u 19,74 mL 0,1 mM NaOH zagrijavajući otopinu na magnetskoj miješalici.

Te dvije otopine sam pomiješala zajedno u omjeru volumena citkrom:ksantin =10:1. Reakcijsku smjesu ksantin oksidaze (XOD) sam pripremila tako što sam kupljeni enzim razrijedila u destiliranoj vodi u ukupnom volumenu od 1 mL. Količina enzima ovisila je o postizanju $\Delta A/\text{min} \approx 0,025$; odnosno 1,5 U i 2,0 U/reakcijskoj smjesi (150 μL enzima + 850 μL dH₂O; 200 μL enzima + 800 μL dH₂O) i čuvana je na ledu omotana aluminijskom folijom.

Aktivnost enzima mjerila sam spektrofotometrijski. U jednu plastičnu kivetu pipetirala sam 2 mL dH₂O i to mi je bila slijepa proba. Za postizanje $\Delta A/\text{min} \approx 0,025$ napravila sam probna mjerenja sa tri različita volumena reakcijske smjese ksantin oksidaze od 15, 20 i 25 μL koju sam pomiješala u kivetu sa 25 μL dH₂O i 1,45 mL smjese ksantina i citokroma. Promjenu apsorbancije (ΔA) mjerila sam unutar tri minute na valnoj duljini od 550 nm.

Kad sam postigla $\Delta A/\text{min} \approx 0,025$, krenula sam s mjerenjem aktivnosti svojih homogeniziranih uzoraka koje sam držala na ledu, te sam u kivetu dodala 25 μL uzorka, 1,45 mL smjese ksantina i citokroma, te enzim i mjerila apsorbanciju unutar tri minute na $\lambda = 550$ nm. Metodologija pripreme kemikalija i mjerenja aktivnosti enzima preuzeta je iz Miliša i sur. 2017.

2. 5. 4 Dokazivanje slobodnih radikala u stanicama na fluorescencijskom mikroskopu

Za dokazivanje prisutnih slobodnih radikala unutar stanica euglena koristila sam dvije boje. Dihidroksietidij (DHE) je boja koja reagira sa superoksidnim anionom i daje crveno obojenje. Dihidrokloroflorescin (H₂DCF) reagira sa vodikovim peroksidom i daje zeleno obojenje.

Boje sam otopila u HEPES mediju pH=7. Pripremila sam 1M radnu otopinu medija, te iz nje pripremila 20 mM otopinu. U epruvetu sam pipetirala 5 μL jedne boje i dodala 995 μL 20 mM HEPES medija. Isti postupak sam ponovila i za drugu boju, te sam omotala epruvete u aluminijsku foliju i držala ih u hladnjaku.

Za potrebe pokusa pripremila sam 200 μM i 400 μM doze imazalila sa čistom kulturom euglena u epruvetama od 1 mL koje sam držala pod tretmanom 8,10 i 12 h. Prije pripreme preparata za gledanje na mikroskopu, uzorke sam inkubirala s bojama 40 min u epruvetama na način da sam pipetirala otopine doza i boja u omjeru 1:1 (15 μL uzorka i 15 μL boje). Na predmetno stakalce sam pipetirala 15 μL otopine uzorka i boje, pokrila predmetnim stakalcem i gledala na fluorescencijskom mikroskopu, a dobivene fotografije sam slikala pomoću Olympus kamere.

3. REZULTATI

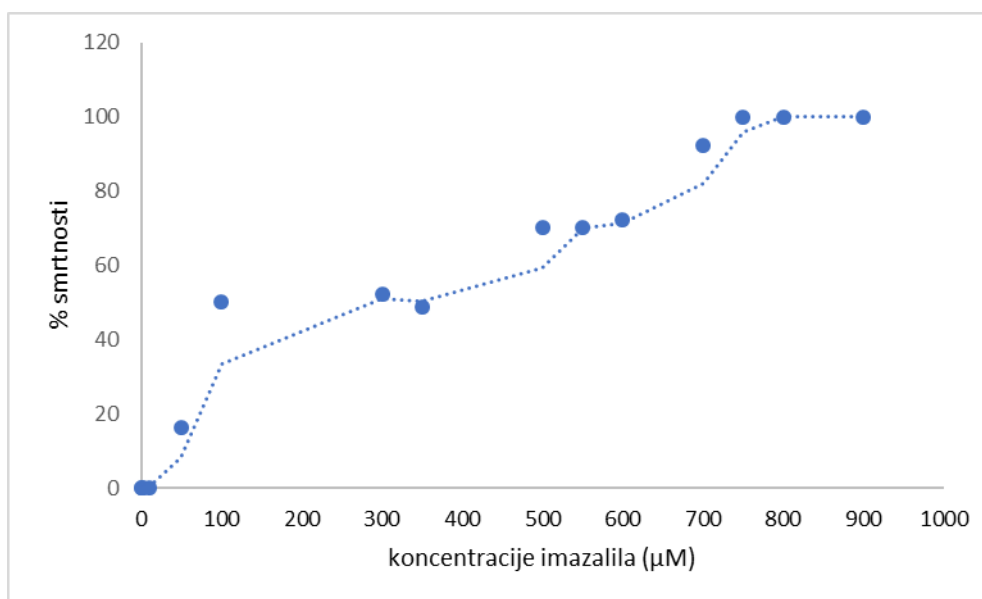
3. 1 Akutno izlaganje populacije *Euglena viridis* imazalilom, brojnost stanica i LC₅₀

Tablica 5. i Slika 19. prikazuju postotke smrtnosti populacije euglena u zatvorenoj laboratorijskoj kulturi, tijekom 24 sata, pri različitim koncentracijama imazalila. Tijekom 24 sata koncentracije imazalila u rasponu doza od 0,1 nM do 10 µM ne uzrokuje smrtnost populacije. NOAEL doza imazalila za euglene, u ovom pokus mogla bi se pripisati 10µM koncentraciji imazalila. LOAEL doza imazalila koja bi djelovala na populaciju euglena je negdje između 10 i 50 µM imazalila. Doze iznad 700 µM uzrokuju oko 90% smrtnosti populacije, a sve doze iznad 750 µM uzrokuju smrt stanica.

Tablica 5. Broj stanica prije tretmana i nakon 24h tretmana različitim koncentracijama imazalila i postotak smrtnosti stanica

DOZA	N x 10 ⁵ pt	N x 10 ⁵ t24	% smrtnosti
0,1 nM	0,996	1,150	0,000
100 nM	1,375	1,396	0,000
2 µM	0,977	1,130	0,000
10 µM	0,840	0,898	0,000
50 µM	2,383	1,992	16,394
100 µM	4,938	2,467	50,027
300 µM	7,500	3,594	52,083
350 µM	6,250	3,203	48,750
500 µM	3,652	1,094	70,053
550 µM	5,781	1,719	70,270
600 µM	6,563	1,819	72,286
700 µM	5,000	0,391	92,188
750 µM	1,270	0,000	100,000

N pt-broj stanica prije tretmana; N t24- broj stanica nakon 24 h tretmana; negativne vrijednosti smrtnosti-tj. kada se u kulturi poticao rast, su vrednovane kao 0

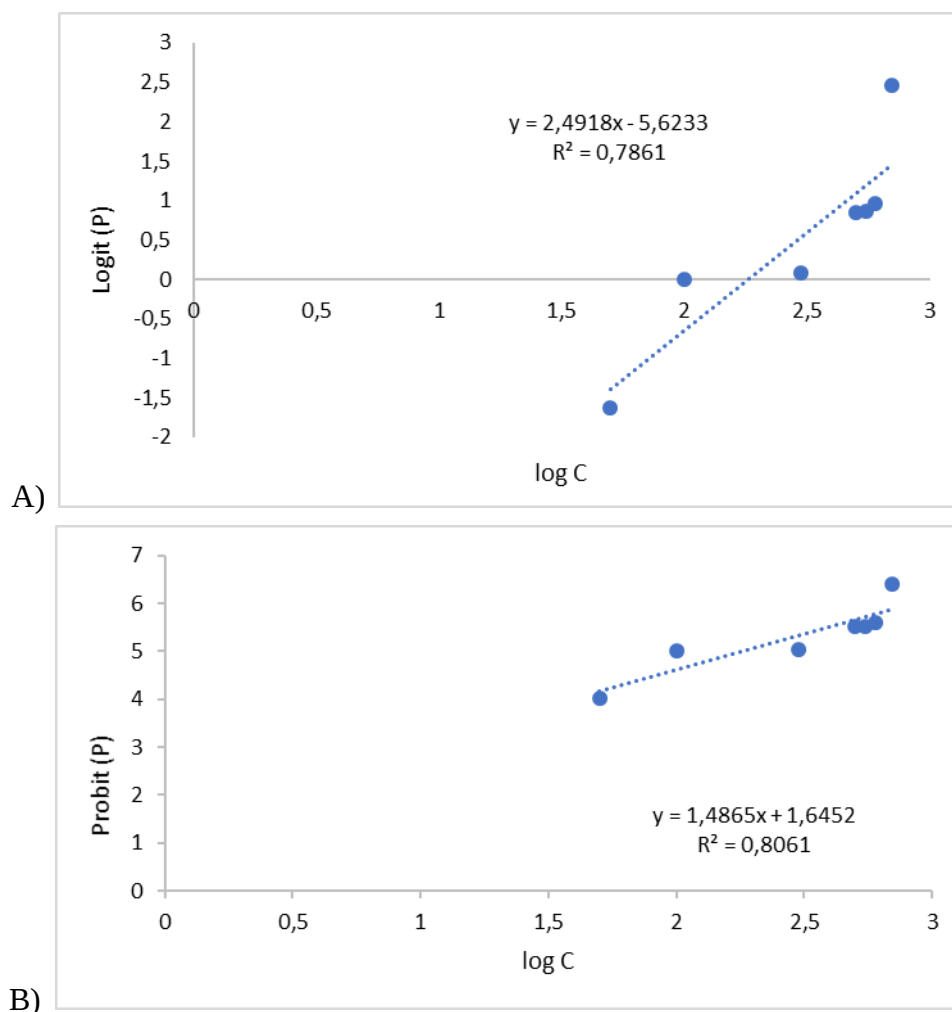


Slika 19. Preživljenje euglena u laboratorijskoj zatvorenoj kulturi i prikaz NOAEL, LOAEL i LC_{50} koncentracija imazalila za euglenu tijekom akutne 24 satne izloženosti (sve vrijednosti koncentracija su uvrštene)

Tablica 6. Broj mrtvih stanica nakon 24h tretmana imazalilom, logaritam primjenjenih doza, proporcija ovisnosti smrtnosti stanica o dozi (P), logaritam proporcije (logit(P)) i probit (P)

DOZA	N x 10 ⁴ pt	N x 10 ⁴ t24	log DOZA	N m x 10 ⁴	Prop (P)	Logit(P)	Probit(P)
50 µM	2,383	1,992	1,699	0,391	0,164	-1,629	4,022
100 µM	4,938	2,467	2,000	2,470	0,500	0,001	5,001
300 µM	7,500	3,594	2,477	3,906	0,521	0,083	5,052
500 µM	3,65234	1,09375	2,699	2,559	0,701	0,850	5,526
550 µM	5,78125	1,71875	2,740	4,063	0,703	0,860	5,532
600 µM	6,5625	1,81875	2,778	4,744	0,723	0,959	5,591
700 µM	5	0,39062	2,845	4,609	0,922	2,468	6,418

N pt-broj stanica prije tretmana; N t24- broj stanica nakon 24 h tretmana; N m-broj mrtvih stanica



Slika 20. Linearizacija podataka ovisnosti proporcije smrtnosti o logaritmu primjenjene doze pomoću: A) logaritma proporcije; B) probit funkcije

Proporciju ovisnosti smrtnosti stanica o primijenjenoj dozi pesticida izračunala sam na način da sam broj mrtvih stanica podijelila sa ukupnim brojem stanica koji sam dobila zbrojem broja mrtvih i živih stanica.

$$\text{Prop (P)} = \frac{\text{broj mrtvih stanica}}{\text{broj mrtvih stanica} + \text{broj živih stanica}}$$

Za linearizaciju podataka upotrijebila sam Logit (P) funkciju gdje sam prirodno logaritmirala (ln) rezultat dobiven dijeljenjem proporcije sa 1- proporcija.

$$\text{Logit (P)} = \ln \frac{\text{Prop (P)}}{(1 - \text{Prop (P)})}$$

Sjecište krivulje podataka sa x-osi predstavlja LC_{50} vrijednost. Za dobivanje jednadžbe krivulje poslužila sam se funkcijama slope (nagib krivulje) i intercept (odsječak na y-osi), a kao točku sjecišta sam uzela 0.

Slope= SLOPE(Logit (P)(cijeli stupac vrijednosti; (Log C (cijeli stupac vrijednosti))

Intercept= INTERCEPT(Logit(P)(cijeli stupac vrijednosti; (Log C (cijeli stupac vrijednosti))

Test value=0

Test value (Probit)=5

Logaritam tražene doze 50 sam izračunala na način da sam od točke sjecišta (0) oduzela vrijednost odsječka na y-osi, te dobiveni rezultat podijelila sa vrijednošću nagiba pravca.

$$\text{Log DOZE} = \frac{\text{Test value} - \text{Intercept}}{\text{Slope}}$$

Dobiveni rezultat sam antilogaritmirala kako bih dobila točnu koncentraciju doze.

Tablica 7 . Nagib pravca, odsječak na y-osi, vrijednosti logaritma doze i LC₅₀

	Logit (P)	Probit (P)
Nagib krivulje:	2,492	1,487
Odsječak na y-osi:	-5,623	1,645
Test vrijednost:	0,000	5
log DOZA:	2,257	2,257
LC₅₀	180,605	180,6486

Probit funkciju od proporcije sam izračunala na način da sam broju 5 dodala inverziju normalne distribucije proporcije.

Probit (P)= 5 + NORM.S.INV(Prop(P))

Na grafičkom prikazu probit funkcije u ovisnosti o logaritmu doze, LC₅₀ vrijednost odgovara vrijednosti 5 probit funkcije koje se nalazi na y-osi.

Iz oba grafička prikaza linearizacije podataka (Slika 20.) i izračuna (Tablica 7.), LC₅₀ doza iznosi 180,605 µM.

3. 2 Deskriptivan opis vijabilnosti populacije *Euglena viridis*

Tablica 8. Deskriptivan opis oblika stanica i pokretljivosti stanica prilikom tretmana različitim dozama pesticida

DOZA	MRTVE	SMEŽURANE	ŽIVE	NORMALNA	SLABA	NEPOKRETNE
K	---	---	+++	+++	---	---
0,1 nM	---	---	+++	++-	+--	++-
1 nM	---	---	+++	++-	+--	++-
10 nM	---	---	+++	++-	+--	++-
100 nM	---	---	+++	++-	+--	++-
2 µM	---	---	+++	++-	+/-	++-
10 µM	---	---	+++	++-	+/-	++-
50 µM	---	---	+++	+++	+/-	---
100 µM	---	---	+++	++-	---	++-
200 µM	---	---	+++	+++	+/-	+--
250 µM	---	---	+++	+++	+/-	+--
300 µM	---	---	+++	++-	+--	++/-
350 µM	---	---	+++	++-	+--	++/-
400 µM	---	---	+++	++-	+--	++-
450 µM	---	---	+++	++-	++-	+++/-
500 µM	---	+/-	+++	+--	+++/-	+++/-
550 µM	+/-	+--	++-	+--	++-	+++
600 µM	+--	++-	++-	+--	++-	+++
650 µM	+--	++-	+/-	+/-	+++	+++
700 µM	+--	++-	+/-	+/-	+/-	+++
750 µM	+++	++	---	---	---	+++

Od nano molarnih pa sve do 500 µM koncentracije sve stanice su žive i pesticide ne utječe na njihovu vijabilnost. U rasponu doza od 550 µM imazalila pa sve do 700 µM povećava se broj smežuranih i mrtvih stanica, te su kod doze od 750µM stanice većinom mrtve, ali ima i dosta smežuranih.

Od najmanjih nano molarnih pa sve do 500 µM koncentracije podjednak je broj normalno pokretnih i nepokretnih stanica, a samo poneke stanice se slabije kreću vjerojatno kao posljedica početnoga šoka djelovanja pesticida. Od 500 µM doze povećava se broj nepokretnih stanica, gdje kod doze od 750 µM sve stanice su nepokretne.

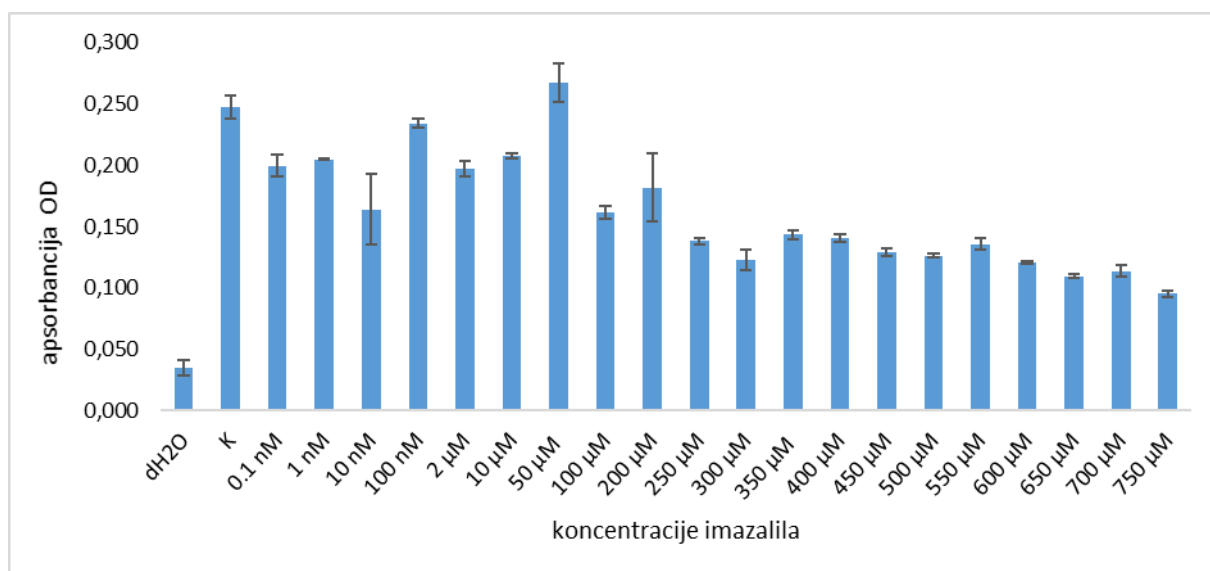
3. 3 Enzimska aktivnost

3. 3. 1 MTS test izloženosti vrste *Euglena viridis* pesticidu imazalilu

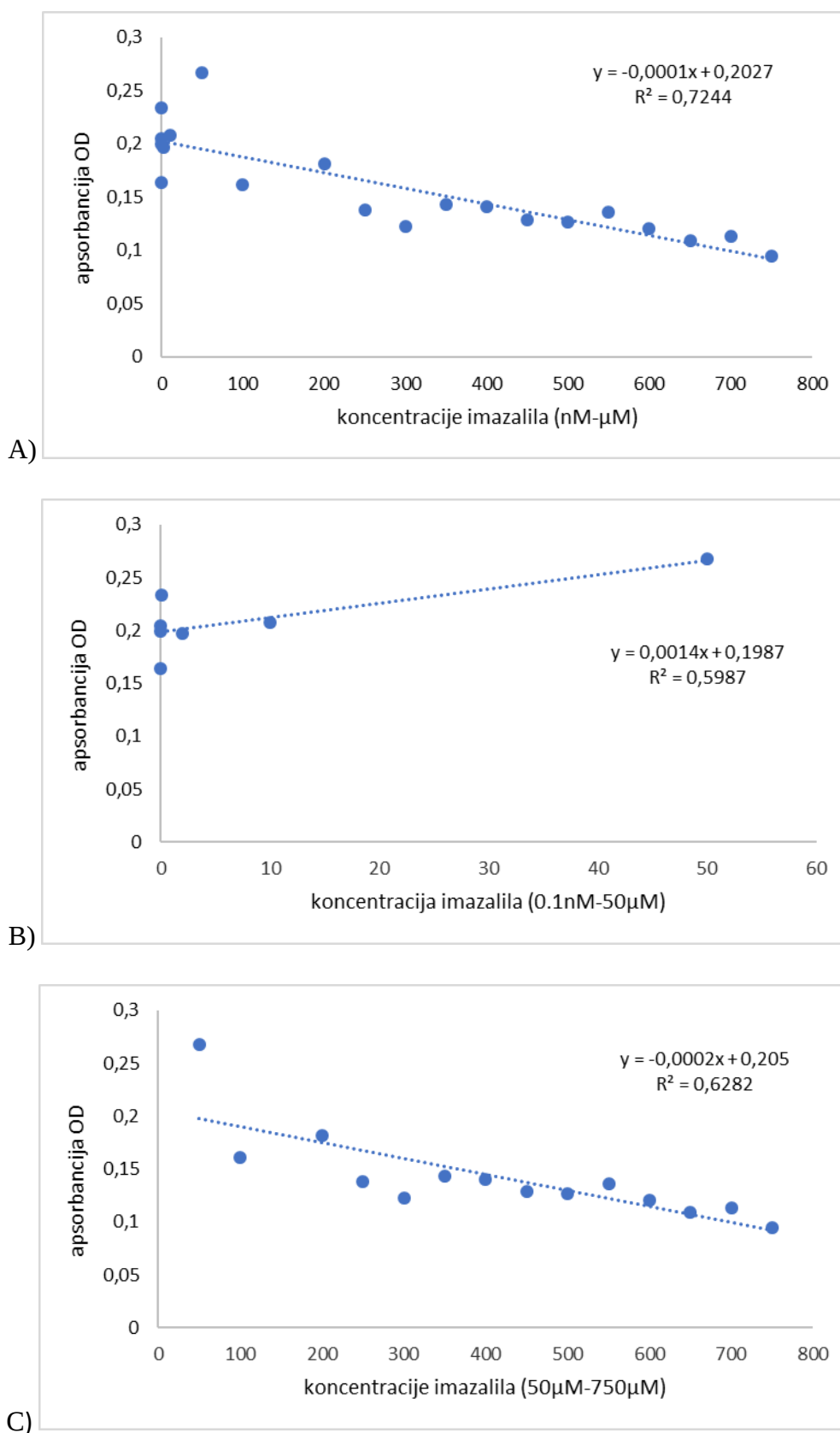
Tablica 9. i Slika 21. prikazuju vrijednosti apsorbancije izmjerene MTS testom pri različitim koncentracijama pesticida imazalila tijekom 24 sata izloženosti. Iz eksperimentalnih podataka vidljivo je da vijabilnost stanica pada kako se povećava primijenjena doza pesticida u odnosu na kontrolu. Od nano molarnih pa do 50 μM koncentracije uočava se blagi porast vijabilnosti u ovisnosti o dozi i to od R2 koeficijenta korelacije 0,5987. 50 μM koncentracija ima donekle jednaku vijabilnost kao i kontrola. Međutim, od 50 μM do 750 μM koncentracije vijabilnost stanica pada za 60% u odnosu na kontrolu skupinu životinja i to od R2 koeficijenta korelacije 0,6282 sa porastom doze imazalila tijekom 24 sata izloženosti (Slika 22.).

Tablica 9. Vrijednosti apsorbancije MTS testa pri različitim dozama pesticida imazalila i njihova srednja vrijednost $\pm$ S.D.

koncentracija imazalila	srednja vrijednost OD	SD	koncnetracija imazalila	srednja vrijednost OD	SD
dH ₂ O	0,035	$\pm 0,007$	250 μM	0,138	$\pm 0,003$
K	0,247	$\pm 0,009$	300 μM	0,123	$\pm 0,008$
0,1 nM	0,2	$\pm 0,009$	350 μM	0,143	$\pm 0,004$
1 nM	0,205	$\pm 0,001$	400 μM	0,141	$\pm 0,003$
10 nM	0,164	$\pm 0,029$	450 μM	0,129	$\pm 0,003$
100 nM	0,234	$\pm 0,004$	500 μM	0,126	$\pm 0,002$
2 μM	0,197	$\pm 0,006$	550 μM	0,136	$\pm 0,005$
10 μM	0,208	$\pm 0,002$	600 μM	0,12	$\pm 0,001$
50 μM	0,267	$\pm 0,016$	650 μM	0,109	$\pm 0,002$
100 μM	0,161	$\pm 0,005$	700 μM	0,114	$\pm 0,005$
200 μM	0,182	$\pm 0,028$	750 μM	0,095	$\pm 0,003$



Slika 21. Vrijednosti apsorbancije izmjerene MTS testom pri različitim dozama pesticida imazalila u rasponu od nanomolarnih do mikromolarnih vrijednosti, vrijednosti u stupcima prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ S.D.



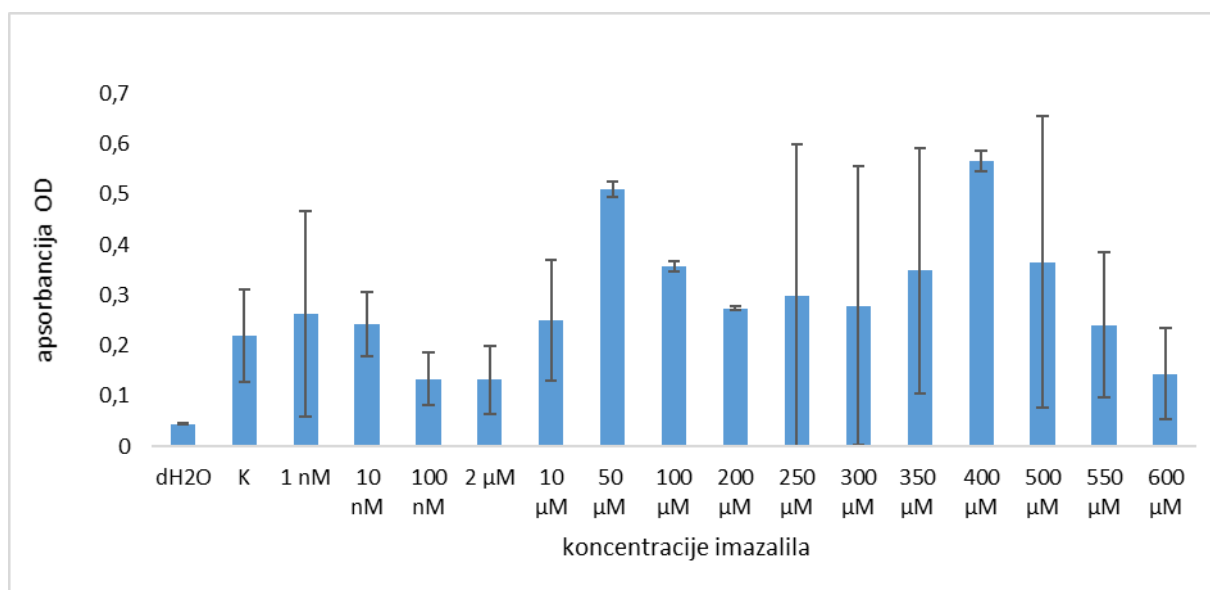
Slika 22. Korelacija koncentracije imazalila i vrijednosti MTS testa. A) korelacijski koeficijenti u rasponu svih analiziranih koncentracija; B) nanomolarni rasponi koncentracija imazalila do 50 μM koncentracije; C) rasponi koncentracije od 50 μM do 750 μM

3. 3. 2 LDH test izloženosti vrste *Euglena viridis* pesticidu imazalilu

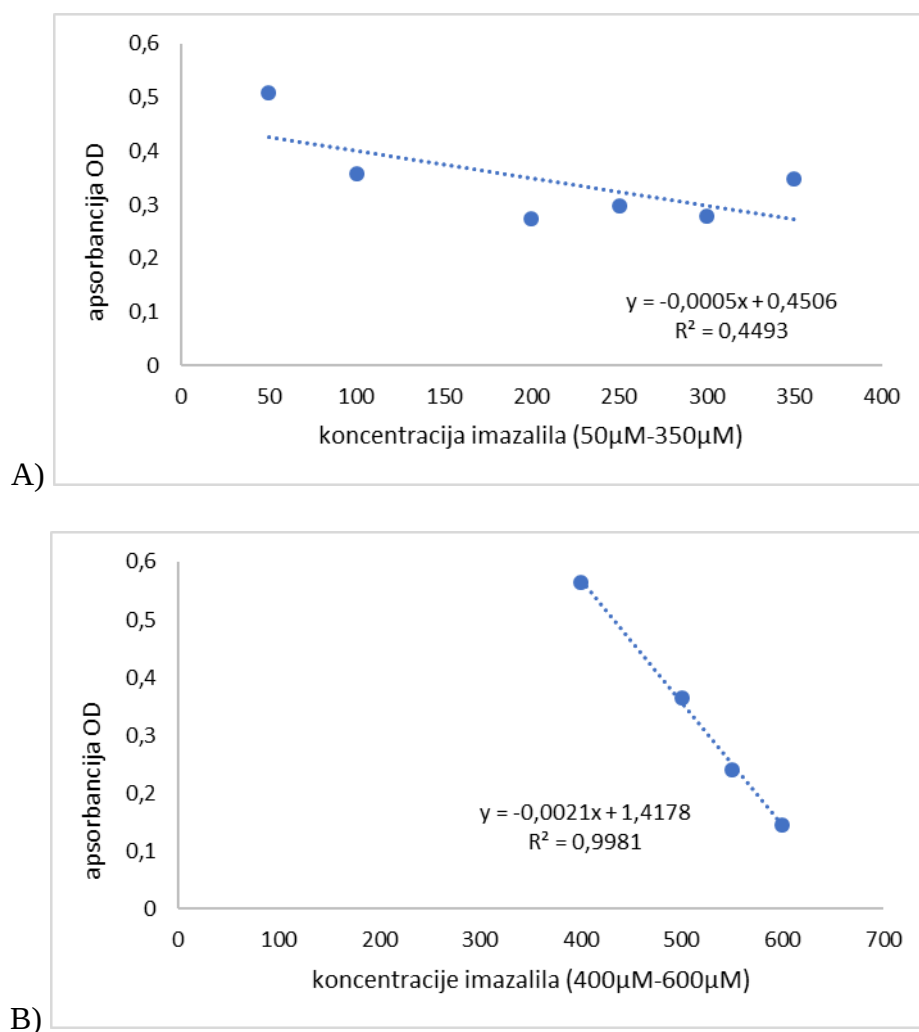
Tablica 10. i Slika 23. prikazuju vrijednosti apsorbancije dobivene LDH testom kod različitih koncentracija pesticida imazalila tijekom 24 sata izloženosti zatvorene laboratorijske kulture euglena. Iz slike 23. vidljivo je da kod koncentracija od 50 μM i 400 μM se potiče metabolička aktivnost enzima gdje se njegova aktivnost povećava za 50% u odnosu na kontrolnu skupinu. Raspon nano molarnih do 10 μM koncentracija pokazuje sličnu aktivnost enzima kao i kontrola.. U rasponu koncentracija od 50 do 350 μM , te od 450 do 750 μM se smanjuje aktivnost enzima za 40% u odnosu na aktivnosti 50 μM i 400 μM koncentracije.

Tablica 10. Vrijednosti apsorbancije LDH testa pri različitim dozama pesticida imazalila i njihova srednja vrijednost $\pm$ S.D.

koncnetracija imazalila	srednja vrijednost OD	SD	koncnetracija imazalila	srednja vrijednost OD	SD
dH ₂ O	0,045	$\pm 0,002$	250 μM	0,298	$\pm 0,300$
K	0,219	$\pm 0,090$	300 μM	0,279	$\pm 0,276$
1 nM	0,263	$\pm 0,204$	350 μM	0,349	$\pm 0,243$
10 nM	0,241	$\pm 0,064$	400 μM	0,565	$\pm 0,021$
100 nM	0,134	$\pm 0,052$	500 μM	0,366	$\pm 0,288$
2 μM	0,132	$\pm 0,067$	550 μM	0,241	$\pm 0,143$
10 μM	0,250	$\pm 0,120$	600 μM	0,144	$\pm 0,091$
50 μM	0,510	$\pm 0,016$			
100 μM	0,357	$\pm 0,011$			
200 μM	0,274	$\pm 0,005$			



Slika 23. Vrijednosti apsorbancije LDH testa pri različitim dozama pesticida imazalila tijekom 24 sata izloženosti u rasponu koncentracija od 0.1 nM do 600 μ M, vrijednosti u stupcima prikazani su kao srednja vrijednost sa $\pm$ S.D.



Slika 24. Korelacija koncentracije imazalila i vrijednosti LDH testa. A) rasponi koncentracija imazalila od 50 do 350 µM; C) rasponi koncentracija imazalila od 400 do 600 µM

Slika 24. prikazuje korelacijsku analizu opadanja aktivnosti enzima u LDH testu u izabranim rasponima koncentracija. Korelacijska analiza pokazuje vrlo slabu povezanost opadanja aktivnosti LDH-a od R2 koeficijenta korelacije 0,4493 za raspon koncentracija od 50 do 350 µM koncentracija. Međutim, vrlo jaka povezanost opadanja aktivnosti enzima javlja se pri većim koncentracijama od 400 µM od R2 koeficijenta korelacije od 0,9981.

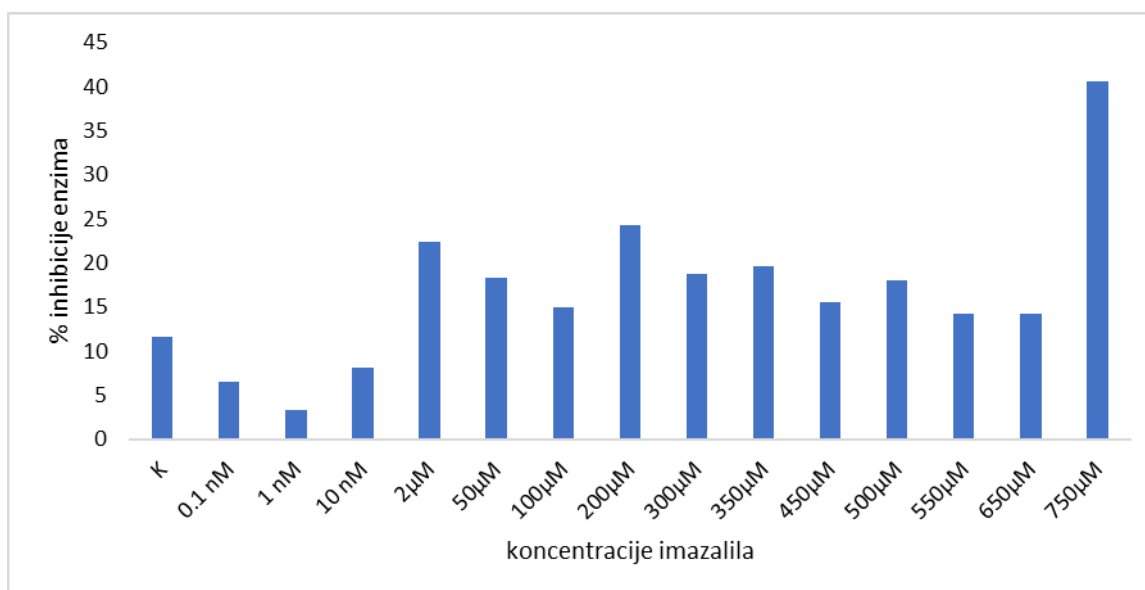
3. 3. 3 Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) kod vrste *Euglena viridis*

Aktivnost glavnog antioksidativnog enzima superoksid dismutaze (SOD), prikazana kao % inhibicije oksidacije citokroma c sa superoksidnim anionom, pokazuje da je izloženost pesticidu imazalilu inducirala aktivnost SOD-a.. Kontrola i nano molarne koncentracije bliske kontroli pokazuju slične vrijednosti aktivnosti enzima. Od 2 μM koncentracije povećava se aktivnost enzima u odnosu na kontrolu za otprilike 50% (Slika 24.).

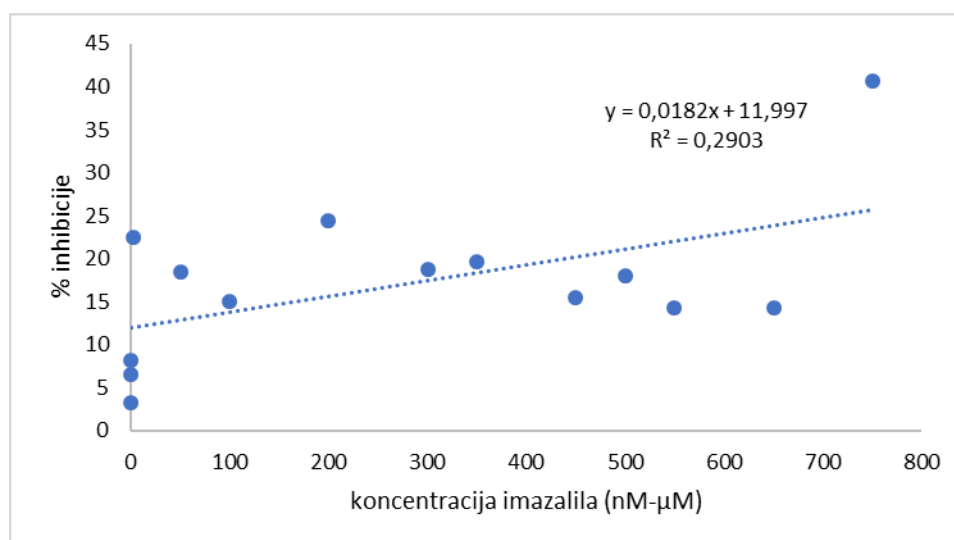
Takva povećana aktivnost enzima ostaje ista sve do 650 μM koncentracije gdje naglo raste kod koncentracije od 750 μM gdje se uočava i do 4 puta veća aktivnost s obzirom na kontrolu.

Tablica 11. Vrijednosti apsorbancije pri različitim koncentracijama pesticida imazalila i postotak inhibicije citokroma c

Uzorci (3x)	ΔA	% inhibicije
K	0,022	11,565
0,1 nM	0,023	6,531
1 nM	0,024	3,265
10 nM	0,023	8,163
2 μM	0,019	22,449
50 μM	0,019	18,376
100 μM	0,020	14,957
200 μM	0,018	24,359
300 μM	0,020	18,776
350 μM	0,020	19,592
450 μM	0,021	15,510
500 μM	0,020	17,959
550 μM	0,021	14,286
650 μM	0,021	14,286
750 μM	0,014	40,598



Slika 25. Postotak inhibicije reakcije oksidiranja citokroma c izmjereno SOD testom pri različitim dozama pesticida imazalila u rasponu koncentracija od 0,1 nM do 750 μM



Slika 26. Korelacijski graf postotka inhibicije SOD-a nakon 24 satne izloženosti zatvorene kulture euglena pesticidu imazalilu

Korelacijska analiza (Slika 26.) pokazuje vrlo slabu povezanost rasta postotka inhibicije enzima od R2 koeficijentom korelacije 0,2903 sa porastom doze imazalila tijekom 24 sata izloženosti.

3. 3. 4 Brojnost vrste *Euglena viridis* u zatvorenoj laboratorijskoj populaciji i trovanja tijekom 18 dana izloženosti pesticidu imazalilu

Tablica 12. i Slika 26. prikazuju dinamiku brojnosti populacije *E.viridis* od 0-18 dana izlaganja pesticida imazalila. Normalna dinamika brojnosti kontrolne skupine koja nije izložena pesticidu pokazuje da nakon nasađivanja početnog broja 1×10^4 stanica, postoji eksponencijalni rast do 4. dana. U kontroli dolazi do blagog opadanja od 16% tijekom 5. i 6. dana. Ovakva oscilacija se ponavlja do 12. dana pokusa kada se populacija ustali od 12.-15. dana, ali iza 15. dana uslijedi finalno opadanje broja stanica. To je normalna dinamika populacije u zatvorenoj kulturi.

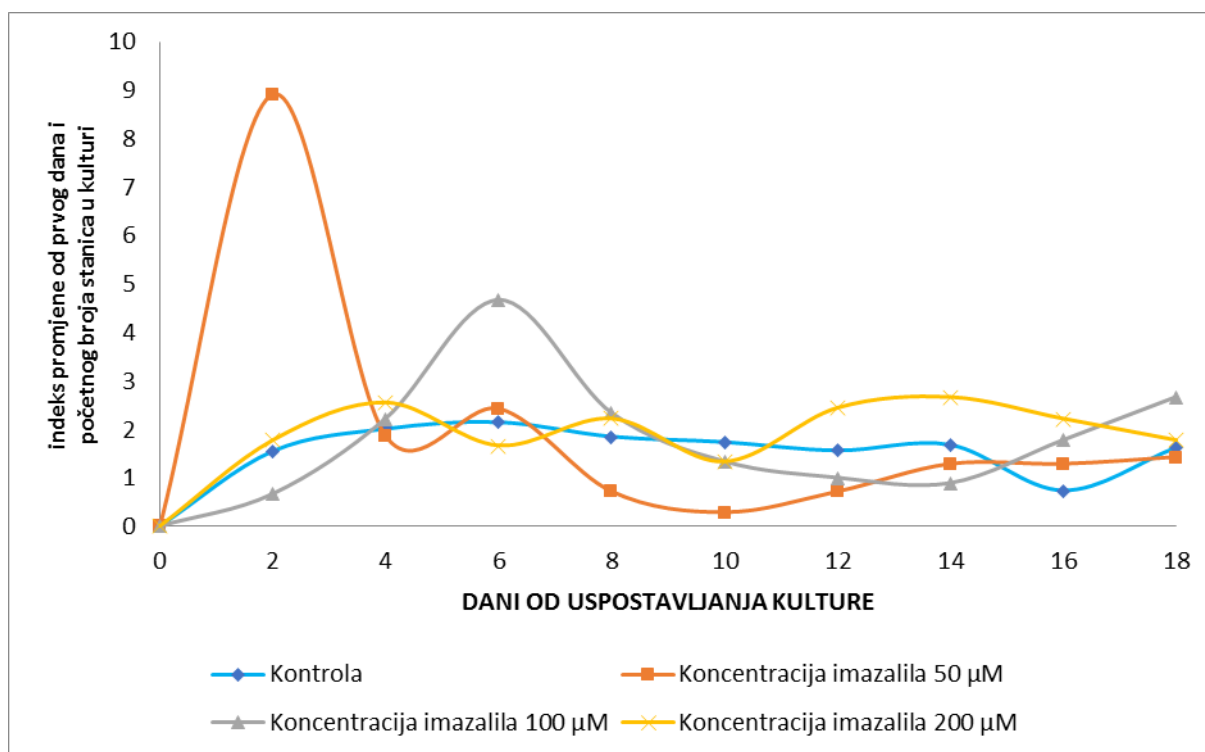
Imazalil u koncentraciji od 50 μM na populaciju djeluje način da stimulira naglo povećanje broja stanica do 4. dana. Međutim, oko 7. dana populacija doživljava izravni pad broja stanica do 14 dana kada se uspostavlja normalna ravnoteža početnog broja stanica.

Koncentracija od 100 μM imazalila uzrokuje početno opadanje broja stanica do 2. dana. Od 2. do 6. dana uočava se porast broja stanica u populaciji koji nije jednak kao u 50 μM skupini, ali se uočava ista dinamika kretanja broja stanica.

Tablica 12. Srednje vrijednosti broja stanica u kontrolnoj populaciji koja nije bila izložena imazalilu i tretmanima sa 50 μM , 100 μM i 200 μM koncentracijama imazalila tijekom 18 dana tretmana pesticidom.

			Koncentracija imazalila					
DAN	Kontrola		50 μM		100 μM		200 μM	
	sred. vrijed. $N \times 10^4$ stanica	S.D	sred. vrijed. $N \times 10^4$ stanica	S.D	sred. vrijed. $N \times 10^4$ stanica	S.D	sred. vrijed. $N \times 10^4$ stanica	S.D
0	1,042	$\pm 0,840$	1,367	$\pm 0,829$	0,879	$\pm 0,967$	0,879	$\pm 0,293$
2	1,615	$\pm 1,048$	12,191	$\pm 15,860$	0,586	$\pm 0,829$	1,563	$\pm 0,391$
4	2,096	$\pm 1,201$	2,539	$\pm 0,276$	1,953	$\pm 1,933$	2,246	$\pm 0,488$
6	2,239	$\pm 0,960$	3,320	$\pm 1,657$	4,102	$\pm 4,143$	1,465	$\pm 0,488$
8	1,927	$\pm 1,615$	0,977	$\pm 1,381$	2,051	$\pm 0,690$	1,954	$\pm 1,563$
10	1,810	$\pm 0,751$	0,391	$\pm 0,552$	1,172	$\pm 1,657$	1,172	$\pm 0,391$
12	1,628	$\pm 1,004$	0,977	$\pm 0,690$	0,879	$\pm 0,690$	2,149	$\pm 0,196$
14	1,750	$\pm 1,710$	1,758	$\pm 0,000$	0,781	$\pm 0,000$	2,345	$\pm 0,000$
16	0,768	$\pm 1,031$	1,758	$\pm 0,000$	1,563	$\pm 0,000$	1,953	$\pm 0,000$
18	1,693	$\pm 0,000$	1,953	$\pm 0,000$	2,344	$\pm 0,000$	1,563	$\pm 0,000$

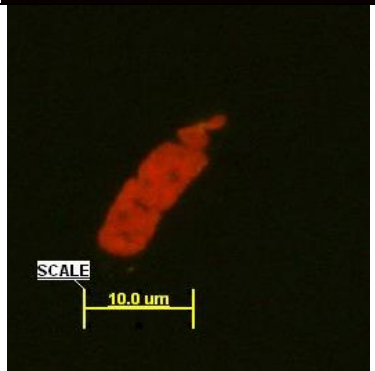
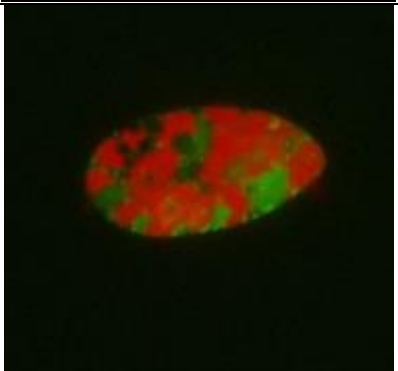
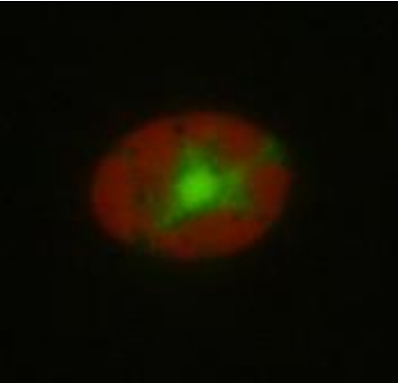
N- broj stanica; S.D.-standardna devijacija; n.m.- nije mjereno



Slika 26. Indeks promjene broja stanica u kontroli koja nije bila izložena imazalilu i tretmanima sa 50 µM, 100 µM i 200 µM koncentracijama imazalila tijekom 18 dana tretmana pesticidom

3. 4 Fluorescencijsko-mikroskopska detekcija intracelularne razine slobodnih radikala superoksidnog aniona fluorescentnom bojom DHE i razine vodikovog peroksida bojom H₂DCF kod vrste *Euglena viridis* pri različitim koncentracijama pesticida imazalila tijekom 4 sata izloženosti

Mikrografije euglene iz kontrolne skupine i nakon 4 sata izloženosti imazalilu (200 µM) 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 H₂DCF i unutarstaničnog vodikovog peroksida koji se nakuplja pri pojačanom oksidativnom stresu. U trećem redu prikazane su pozitivne kontrole, odnosno stanice tretirane formalinom (1µM), što je standardna toksična tvar za izazivanje povećanog oksidativnog stresa unutar stanica.

	KONTROLA		IMAZALIL 200 μ M nakon 4 sata	
IMAZALIL 200 μ M DHE boja za superoksidnion				
IMAZALIL 200 μ M H ₂ DCF boja za vodikovv peroksid u stanici				
	DHE boja		H ₂ DCF boja	
POZITIVNA KONTROLA TRETIRANA SA 1 μ M FORMALINOM 4h				

Slika 27. VIS i Fluorescentna mikroskopske slike stanica euglena obojanih vitalnim bojama DHE i H₂DCF.

4. RASPRAVA

Pri akutnim koncentracijama, tijekom 24 sata, imazalil u rasponu doza od 0,1 nM do 10 μ M ne uzrokuje smrtnost populacije. NOAEL doza imazalila za euglene u ovom pokusu mogla bi se pripisati 10 μ M koncentraciji. LOAEL doza imazalila koja bi djelovala na populaciju euglena je 50 μ M. Sve doze iznad 750 μ M imazalila uzrokuju smrt stanica. U literaturnim izvorima ne postoje podaci u o NOAEL, LOAEL i LC₅₀ koncentracijama za ovaj pesticid na istraživanoj vrsti *E. viridis*, stoga prilikom izrade raznih modela simulacija mogućeg utjecaja rezidualnog pesticida imazalila u prirodi, ovi podaci mogu biti od vrlo velike važnosti. Možemo pretpostaviti da primjenom pesticida u koncentraciji višoj od 700 μ M u prirodi može dovesti do nestanka populacije euglena na nekom staništu.

Manje doze imazalila ne utječu na samu vijabilnost stanica, ali uzrokuju promjene u pokretljivosti stanica. Prilikom tretiranja dozama u rasponu koncentracija od 0,1 nM do 100 μ M pola stanica postaje nepokretnima, a pojedine pokazuju slabu pokretljivost uslijed početnoga šoka nastalog djelovanjem pesticida. Primjenom većih doza pesticida, iznad 500 μ M, dolazi i do promjena u vijabilnosti i pokretljivosti stanica. Povećava se broj mrtvih i nepokretnih stanica, a pojavljuju se i smežurane, odnosno kontrahirane stanice. Takav oblik stanica je znak šoka i javlja se kao odgovor na povećane koncentracije onečišćivača, kemijskih ili fizičkih stresora kod vrsta iz roda *Euglena* (Azizullah i sur., 2010; Conforti 1998; Mikolajczyk i Diehn 1978; Murray 1981; Takenaka i sur., 1997).

Imazalil osim na ponašanje i morfologiju stanica, utječe i na njihovu metaboličku aktivnost. Rezultati dobiveni MTS testom pokazuju da u rasponu koncentracija imazalila od 50 μ M do 750 μ M pada aktivnost MTS enzima za 60% u odnosu na kontrolu skupinu organizama. Korelacijska analiza pokazuje povezanost opadanja aktivnosti MTS-a u navedenom rasponu koncentracija od R2 koeficijenta korelacije 0,72444, te je izravno povezana i recipročna sa porastom doze, odnosno okolišne koncentracije imazalila u kulturi *E. viridis*.

Aktivnost enzima LDH se potiče kod koncentracija od 50 μ M i 400 μ M i to čak za 50% u odnosu na kontrolnu skupinu, dok ostale koncentracije u rasponu pokazuju sličnu aktivnost kao i kontrolna. Prema rezultatima enzim LDH nije osjetljiv na pesticid imazalil.

Ukupni metabolizam piruvata i laktata u stanici euglena nije povezan sa porastom doze jer većina stanica pokazuje normalnu metaboličku aktivnost enzima kao i u kontroli. Rezistentne stanice u kulturi pokazuju povećanu aktivnost enzima kao odgovor na stres i imaju tendenciju razmnožavanja i naglog povećanja broja stanica u populaciji do 4. dana. Ipak, određena razina stresa je prisutna u stanicama jer redukciju metaboličke aktivnosti MTS testom možemo povezati sa činjenicom da energija koja je potrebna za pokretanje i kontrakciju fibrila dolazi od ATP-a koji se proizvodi u mitohondrijima kinetosoma, a nepokretnost stanica vidljiva je i pri malim dozama pesticida.

Prilikom ekstrapolacije ovakvih rezultata o ukupnoj populaciji u kojoj je prisutna redukcija MTS enzima od 60% i pojačanu aktivnost LDH enzima na ekosustave kopnenih voda, možemo reći da je ovo važan podatak koji govori da prisutnost imazalila u okolišu ili ekosustavima ima mogućnost redukcije određene stope metaboličke izmjene tvari i ukupnog protoka energije, kao i biološke produkcije na određenoj trofičkoj razini ili ekološkoj niši koju zauzima *E. viridis* u prirodi. Povećanje metabolički važnog enzima LDH je popraćeno sa uočenim povećanjem broja stanica u populaciji tijekom nekoliko dana. Očito je da za intenzivnu diobu stanica se mora povećati stopa metabolizma. S povećanjem broja stanica nastalih diobom raste i količina enzima u istraživanom uzorku.

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

Naime, blagi porast intenziteta fluorescencije boje DHE ukazuje na blago povećanje količine superoskidnog aniona. U trećem redu uočava se vrlo intenzivno pojačanje zelene fluorescencije koja je karakteristična za reakciju boje H₂DCF i unutarstaničnog vodikovog peroksida koji se nakuplja pri pojačanom oksidativnom stresu.

Poremećaj metabolizma (temeljem MTS 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 intenzivnog stvaranja unutarstaničnog vodikovog peroksida. I povećana aktivnost enzima SOD, približno 2-2.5 puta više u odnosu na kontrolnu skupinu što ukazuje da su stanice pod oksidativnim stresom.

Povećanjem koncentracije imazalila iznad 200 μM , aktivnost enzima se inducirala za približno 2-2,5 puta u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedan od zajedničkih mehanizama toksičnosti različitih ksenobiotika je i oksidacijski stres koji se javlja kao posljedica poremećene metaboličke redoks ravnoteže energetske reakcije (Garza et al., 2008; Hu et al. 2015). Jednostanični organizam *E. viridis* je dobar bioindikatorski modelni organizam zbog svoje osjetljivosti na promjene u okolišu. Osim ove vrste i drugi pripadnici roda *Euglena*, poput vrste *E. gracilis*, pokazali su dobar bioindikatorski potencijal u nekim toksikološkim studijama (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 razine MDA tj. lipidne peroksidacije, u stanicama *E. gracilis* nakon 10 dnevne izloženosti grafenu oksidu imaju izravnu vezu sa povećanjem doze. Aktivnosti katalaze (CAT) i superoksidne dismutaze (SOD) *E. gracilis* 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 imazalilom, i u manjim dozama koji ne uzrokuju smrtnost, već čak djeluju stimulativno 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 karbofurnana od 50 mg/L dok prisutnost malationa pri svim ispitivanim koncentracijama nije utjecala 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 organskih spojeva mogu inducirati rast populacije i 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 koncentracijama (3 μM i 5 μM) uzrokuje 95% smrtnosti stanica nakon 24 sata, zabilježene su granulirane i abnormalne stanice, te promjene u obliku i boji stanica (Peng i sur., 2015).

Neki radovi govore kako i male koncentracije od 1 ili 10 ppm određenih pesticida mogu negativno djelovati na populaciju vrste prvih 24 h izloženosti, ali pri izloženosti dužoj od 24h 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 kontrolne populacije koja počinje blago oscilirati nakon 4. dana, ali održava stalno ravnotežno stanje sve do 16. dana kada počinje propadati.

5. ZAKLJUČAK

- Pri akutnim koncentracijama, tijekom 24 satne izloženosti pesticidu imazalilu, raspon koncentracija od 0,1 nM do 10 μ M ne uzrokuje smrtnost populacije. NOAEL koncentracija imazalila koja ne uzrokuje smrt stanica u populaciji je 10 μ M. LOAEL doza imazalila koja bi djelovala na populaciju euglena je 50 μ M, a pri kojoj se uočavaju prvi postotci smrtnosti stanica u populaciji. LC₅₀ doza imazalila za populaciju euglena je 180 μ M. Sve doze iznad 700 μ M imazalila uzrokuju 90-100 % smrtnosti euglena u populaciji.
- Pri niskim koncentracijama imazalila dolazi do promjena u kretanju stanica, 50% organizama u populaciji postaje nepokretnim, a poneki su slabo pokretni. Pri dozama višim od 500 μ M imazalila dolazi do promjena u vijabilnosti stanica, a većina stanica se smežurala pri dozama većim od 600 μ M.
- Metabolizam eugleninih stanica je poremećen za 60% kod doza imazalila većih od 50 μ M, jer je blokirana aktivnost enzima MTS-a. Međutim, aktivnost enzima LDH pri 50 μ M i 400 μ M koncentracijama imazalila je potaknuta za 50 %, a ostale koncentracije u rasponu pokazuju normalnu aktivnost enzima.
- Poremećaj metabolizma (temeljem MTS testa) indirektno prati i promjena unutarstanične redoks ravnoteže biokemijskih reakcija. Blagi porast intenziteta fluorescencije boje DHE ukazuje na blago povećanje količine superoskidnog aniona. Unutar stanica (pri dozi od 200 μ M imazalila) dolazi do intenzivnog stvaranja unutarstaničnog vodikovog peroksida. Povećana aktivnost enzima SOD, približno 2-2,5 puta više u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazuje da su stanice pod pojačanim oksidativnim stresom.

Primjenom niskih koncentracija pesticida imazalila na vrstu *E. viridis* ne dolazi do promjena u vijabilnosti stanica, vidljive su promjene u pokretljivosti, a pri višim dozama pesticida dolazi do smrtnosti stanica. Pesticid imazalil negativno utječe na metaboličku aktivnost i unutarstaničnu redoks ravnotežu biokemijskih reakcija. Metabolički važan enzim LDH nije osjetljiv na pesticid, štoviše njegova aktivnost se potiče primjenom pesticida. Imazalil izaziva oksidativni stres u stanicama. Pod povećanim stresom, organizmi stvaraju vodikov peroksid, a povećane su i količine superoskidnog aniona unutar stanica.

6. LITERATURA

Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, L., Bass, D., Bowser, S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Le Gall L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C.L., Smirnov A., Spiegel F.W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 429–514.

Amanchi N.R i Hussain M.M. 2008. Cytotoxic effects of delfin insecticide (*Bacillus thuringiensis*) on cell behaviour, phagocytosis, contractile vacuole activity and macronucleus in a protozoan ciliate *Paramecium caudatum*. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2637-2643.

Amanchi N.R. 2010. A low cost microbiotest for screening behavioural and ecotoxicological responses of *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax* to azadirachtin. *Advances in Applied Science Research*, 1, 124–131.

Amanchi N.R. 2010. Toxicity assessment of monocrotophos using a single cell protozoan ciliate *Paramecium*. *Annual Journal of Natural Sciences*, 1, 56–60.

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.

Bicudo C.E.dM. i Menezes M. 2016. Phylogeny and classification of Euglenophyceae: a brief review. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4:17. doi: 10.3389/fevo.2016.00017

Bonnemain H., Dive D., 1990. Studies on synergistic toxic effects of copper and dithiocarbamate pesticides with the ciliate protozoan *Colpidium campylum* (Stokes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19, 320–326.

Castillo L.E., Ruepert C., Solis E. 2000. Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the north atlantic zone of Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1942–1950.

Coleman R.D., Coleman R.L., Rice E.L 1971. Zink 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.

DiacriTech 2009. Figure-zoology <http://www.diacritech.com/gwps/z_figure-zoology.pdf> (pristupljeno 13.09.2017)

Dive D., Leclerc H., Persoone G. 1980. Pesticide toxicity on the ciliate protozoan *Colpidium campulum*: possible consequences of the effect of pesticides in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 4, 129–133.

Dive, D. i Persoone, G. 1984. Protozoa as test organisms in marine ecotoxicology: luxury or necessity? *Ecotoxicological testing for the marine environment*, 1, 281–305.

Ekelund F., Rønn R., Christensen S. 1994. The effect of three different pesticides on soil protozoan activity. *Pesticide Science*, 42, 71–78.

Ekelund F. 1999. The impact of the fungicide fenpropimorph on bacterivorous and fungivorous protozoa in soil. *Journal of Applied Ecology*, 36, 233–243.

Ekelund F., Westergaard K., Soe D. 2000. The toxicity of the fungicide propiconazole to soil flagellates. *Biology and Fertility of Soils*, 31, 70–77.

EMA 1998. Committee for veterinary medicinal products-Enilconazole, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014130.pdf> (pristupljeno 27. srpnja 2017.)

Eniscoula 2011. Life, Protista <<http://www.eniscuola.net/en/argomento/protista/>> (pristupljeno 23. rujna 2017.)

EXTOXNET 1993. Extension Toxicology Network, Pesticide Information Profiles <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxfop-methylparathion/imazalil-ext.html>> (pristupljeno 27. srpnja 2017.)

EXTOXNET 1996. Extension Toxicology Network, Pesticide Information Profiles <<http://extoxnet.orst.edu/pips/imazalil.htm>> (pristupljeno 27. srpnja 2017.)

FAO 2001. FAO specifications and evaluations for plant protection products, Food and agricultural organization of the United Nations <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/imazalil.pdf> (pristupljeno 27. srpnja 2017.)

Foissner W. 1997. Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 62, 93–103.

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.

Hikal W.M., Al-Herrawy A.Z., El-Daly E.S., Elowa S.E 2015. Assessment of pesticide toxicity using the freshwater amoeba *Rosculus ithacus* in vitro. *Pyrex Journal of Research in Environmental Studies*, 2, 8-12.

Houneida B., Berrebah H., Berredjem M., Djebbar M. 2012. Effect of novel phosphoramidate on growth and respiratory metabolism of *Paramecium aurelia*. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 3, 48-51.

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.

Hussain M.M., Amanchi N.R, Solanki V.R, Bhagavathi M. 1971. Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. *Pesticide biochemistry and physiology*, 90, 66-70.

Jain, K. 2013. Study Notes on *Euglena Viridis* (With Digram) <<http://www.biologydiscussion.com/animals-2/phylum-protozoa/study-notes-on-euglena-viridis-with-digram/32548>> (pristupljeno 05. kolovoza 2017.)

Kaur, H. 2016. Animal diversity - i non-chordates, protozoa. <https://www.researchgate.net/publication/237800064_ANIMAL_DIVERSITY_-_I_NON-CHORDATES_PROTOZOA#pfc> (pristupljeno 26. rujna 2017.)

Kershaw D.R. 1988. Animal diversity. Chapman & Hall, London,UK.

Kumar S., Lal R., Bhatnagar P. 1989. The effects of dieldrin, dimethoate and ermethrin on *Tetrahymena pyriformis*. Environmental Pollution , 57, 275-280.

Lal S., Saxenab D.M., Lal R. 1987. Uptake, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on *Tetrahymena pyriformis*. Pesticide Science, 21, 181–191.

Leander, B.S., Esson, H.J., Breglia, S.A. 2007. Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. Bioessays, 29, 987–1000.

Leander B.S, Lax G., Karnkowska A., Simpson A.G.B 2017. Euglenoida. U: J.M. Archibald et al. (eds.) Handbook of the Protists, DOI 10.1007/978-3-319-32669-6_13-1

MaCrae I.C. i Vinckx E., 1973. Effect of lindane and DDT on populations of protozoa in a garden soil. Soil Biology & Biochemistry, 5, 245–247.

Mannens, G., Van Leemput, L., Heykants, J. 1993. General metabolism of imazalil. Neobjavljeni izvještaj, No. R 23979/FK1116. Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Janssen Research Foundation, Turnhoutseweg, Beerse, Belgium. Submitted to WHO by Janssen Pharmaceutica NV. OECD Guideline for testing chemicals 'toxicokinetics' 417, 4 April 1984; Directive 87/302/EEC Part B. GLP: OECD, US Food and Drug Administration (21CFR part 58), US Environmental Protection Agency (40CFR part 160)

Mansano A.S, Moreira R. A.,Pierozzi M., Oliveira T.M.A.,Vieira E. M.,Rocha O., Regali-Selegim M.H. 2016. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. Environmental Pollution, 213, 160–172.

Matoničkin I. 1990. Beskralješnjaci: biologija nižih avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb.

Guiry, M.D i Guiry, G.M. 2017. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <www.algaebase.org> (pristupljeno 23. rujna 2017.)

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. *The Journal of Protozoology*, 25, 461–470.

Miliša M., Đikić D., Mandić T., Grozić D., Čolić I., Ostojić A. 2017. Response of aquatic protists to electric field exposure. *International Journal of Radiation Biology*, DOI: 10.1080/09553002.2017.1321809

Miloš S. 2014. Pesticidi-procjena rizika, Hrvatska agencija za hranu, CROLAB-Sekcija za hranu
<https://www.crolab.hr/userfiles/file/KAL/Milos_Pesticidi_procjena_rizika_5.9.2014.pdf>
(pristupljeno 28. srpnja 2017.)

Murray JM. 1981. Control of cell shape by calcium in the Euglenophyceae. *Journal of Cell Science* 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.

Plachno B.J, Wołowski K, Augustynowicz J. i Łukaszek M. 2015. Diversity of algae in a thallium and other heavy metals-polluted environment. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 51, 139–146.

Priyadarshini, S. 2013. Asexual and sexual reproduction in animals (with diagram)
<<http://www.biologydiscussion.com/reproduction/asexual-and-sexual-reproduction-in-animals-with-diagram/5110>> (pristupljeno 05. kolovoza 2017.)

Promega 2003. CellTiter 96® A Queous One Solution Cell Proliferation Assay Instructions for Use of Products G3580 and G3581
<http://www.ebiotrade.com/emgzf/promega2003_7/8.htm> (pristupljeno 24. srpnja 2017.)

Promega 2012. CellTiter 96® A Queous One Solution Cell Proliferation Assay Instructions for Use of Products G3580, G3581 and G3582 <<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>> (pristupljeno 24. srpnja 2017.)

Promega 2016. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Instructions for Use of Product G1780 <<https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability->

and-cytotoxicity-assays/cytotox-96-non_radioactive-cytotoxicity-assay/?catNum=G1780>
(pristupljeno 24. srpnja 2017)

PubChem 2005. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=37175, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37175>> (pristupljeno 27. srpnja 2017.)

Rachid R., Saci F. Z., Berrebbah H., Djebar M.R. 2009. Toxic effects of combined molecule from novaluron and diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences, 1, 74–80.

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.

Roy, J., Faktorová, D., Lukeš, J., Burger, G. 2007. Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. Protist, 158, 385-396.

R&D Systems 2017. Superoxide Dismutase Assay Kits < <https://www.rndsystems.com/products/superoxide-dismutase-assay-kits>> (pristupljeno 24. srpnja 2017.)

Shah, R. 2013. *Euglena Viridis*: Habitat, Structure and Locomotion | Protozoa <<http://www.biologydiscussion.com/invertebrate-zoology/protozoa/euglena-viridis-habitat-structure-and-locomotion-protozoa/28141>> (pristupljeno 05.kolovoza 2017.)

Shubhamsingh T. i Tejashree S., 2014. Effect of neurotoxic insecticide dimethoate on unicellular freshwater Protozoan Ciliate *Paramecium* sp. International Research Journal of Biological Sciences., 3, 62–66.

Simpson A.G.B. 1997. The identity and composition of the Euglenozoa. Arch. Protistenk. 148, 318–328.doi:10.1016/s0003-9365(97)80012-7

Sriram S. i R. Seenivasan, R. 2012. Microalgae cultivation in wastewater for nutrient removal. Journal of Algal Biomass Utilization, 3, 9–13.

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. Journal of Eukaryotic Microbiology, 44, 609–613.

Tharavathy N.C. i Hosetti B.B. 2014. Impact of cadmium on the biodiversity of algae, protozoa, bacteria and fungi grown in oxidation ponds. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3, 58-63.

The Microbiology 09, 2011. *Euglena viridis* - BF, DIC microscope 400x <<https://www.youtube.com/watch?v=4MIR3dKfXmc>> (pristupljeno 09. kolovoza 2017.)

US EPA 2005. Pesticides-EPA R.E.D Facts, United States Prevention Environmental Protection Agency; Prevention, Pesticides And Toxic Substances <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/2325fact.pdf>> (pristupljeno 27. srpnja 2017.)

Yamaguchi, A., Yubuki, N., Leander, B.S. 2012. Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n.gen.etn.sp. (Euglenozoa, Euglenida). BMC Evolutionary Biology 12:29.doi:10.1186/1471-2148-12-29

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11. svibnja 1991. u Rijeci gdje sam završila Osnovnu školu „Eugena Kumičića“. 2006. godine upisala sam Salezijansku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti-opći smjer za sportaše. Gimnaziju sam završila 2010. godine kada sam upisala preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Nakon završenog preddiplomskog studija upisala sam diplomski studij Ekologije i zaštite prirode-modul more. Tijekom studija sudjelovala sam na manifestacijama „Noć biologije“ za koju sam osvojila posebnu Rektorovu nagradu za akademsku godinu 2011./2012.

Tijekom svog osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja aktivno sam se bavila plivanjem i bila članica Pk „Primorje“, a trenutno sam član Zbora plivačkih sudaca Grada Zagreba gdje aktivno sudim na međunarodnim i državnim plivačkim natjecanjima diljem Hrvatske. 2008. godine volontirala sam na Europskom prvenstvu u malim bazenima u gradu Rijeci. Tijekom školovanja u Zagrebu, preko studentskog centra radila sam u Blitz - Cinestaru u Branimir centru, te razvila svoje komunikativne i organizacijske vještine u radu s ljudima.