

# Mramorni rak kao modelni organizam za istraživanje utjecaja organskih zagađivala na slatkovodne beskralježnjake

---

Tarandek, Anita

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:944324>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**MRAMORNI RAK KAO MODELNI ORGANIZAM ZA ISTRAŽIVANJE UTJECAJA  
ORGANSKIH ZAGAĐIVALA NA SLATKOVODNE BESKRALJEŽNJAKE**

**MARBLE CRAYFISH AS A MODEL ORGANISM FOR EXAMINING THE IMPACTS  
OF ORGANIC POLLUTANTS ON FRESHWATER INVERTEBRATES**

SEMINARSKI RAD

Anita Tarandek

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate Study of Biology

Mentor: doc. dr. sc. Sandra Hudina

Zagreb, 2020.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. MRAMORNI RAK – <i>Procambarus virginalis</i> (Lyko, 2017) .....	3
3. ORGANSKA ZAGAĐIVALA.....	5
3.1. Utjecaj prometrina.....	6
3.2. Utjecaj cipermetrina .....	9
3.3. Utjecaj metazaklora i metabolita metazaklor OA .....	11
4. ZAKLJUČAK.....	14
5. LITERATURA .....	15
6. SAŽETAK .....	22
7. SUMMARY .....	22

# 1. UVOD

Slatkovodni ekosustavi, iako zauzimaju tek 0,8% površine Zemlje, jedni su od najbogatijih ekosustava, odnosno imaju najveći broj vrsta po jedinici površine (Dudgeon i sur. 2006). Predstavljaju dom mnogim organizmima, međutim smatra se da su jedni od najugroženijih na Zemlji (Strayer i Dudgeon 2010). Tome uvelike doprinosi antropogeni utjecaj. Brojni antropogeni pritisci na slatkovodne ekosustave su zagađenje, pretjeran izlov slatkovodnih organizama, otpadne vode i unos stranih, invazivnih vrsta najviše doprinose degradaciji slatkovodnih ekosustava diljem svijeta (Dudgeon i sur. 2006; Strayer 2006). Osobito je značajan utjecaj organskih zagađivala u vodenim ekosustavima gdje često nalazimo prisutnost industrijskih kemikalija i kemikalija koje se koriste u poljoprivredi, kao što su primjerice pesticidi. Oni mogu utjecati i na neciljane organizme što dovodi do dramatičnih ekoloških promjena u vodenom okolišu (Velisek i sur. 2012a, 2013; Stara i sur. 2012, 2013, 2014).

Uz zagađenje, invazivne strane vrste su jedna od dominantnih sastavnica antropogenog poremećaja okoliša s velikim gospodarskim i ekološkim utjecajima. Invazivna vrsta je strana vrsta čije naseljavanje i/ili širenje ugrožava biološku raznolikost, zdravlje ljudi ili uzrokuje ekonomsku štetu (Zakon o zaštiti prirode, NN 80/13). Smatra se da su zagađeni ekosustavi skloniji invazijama, a prema Međunarodnoj uniji za očuvanje prirode (engl. International Union for Conservation of Nature, IUCN) invazivne strane vrste su jedan od vodećih čimbenika gubitka biološke raznolikosti (Lodge i sur. 2000, IUCN, 2016).

Deseteronožni rakovi imaju ključnu ulogu u održavanju strukture zajednica slatkovodnih ekosustava: među najvećim su breskralježnjacima, dugo žive, agresivni su, te bioturbacijom i ukopavanjem u sediment i dno za izradu skloništa (Johnson i sur. 2011) utječu na dinamiku transporta sedimenta i stabilnost obala (Faller i sur. 2016). Nadalje, s obzirom da su generalisti, rakovi imaju ključnu ulogu u vodenom staništu, prenoseći energiju unutar hranidbene mreže i između vodenih i kopnenih hranidbenih lanaca kao potrošači velikog broja različitih izvora hrane i kao plijen za brojne kralježnjake, od riba do sisavaca (Crehuet i sur. 2007). U samom ekosustavu invazivne strane vrste slatkovodnih rakova su u kompeticiji za prostor i hranu sa zavičajnim vrstama rakova te tako ih istiskuju. Obično su agresivnije od nativnih vrsta (Söderbäck 1991; Usio i sur. 2001) brže rastu, imaju veći fekunditet i ranije spolno sazrijevaju

(Huber i Schubart 2005), te mogu biti vektori bolesti koje su letalne za zavičajne rakove, poput uzročnika račje kuge *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906) (Filipova i sur. 2013)

## 2. MRAMORNI RAK – *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017)

Mramorni rak pripada porodici Cambaridae koja uključuje 12 rodova i karakteristična je skupina za Sjevernu Ameriku (Taylor 2002). Rod *Procambarus* sa svojih 163 vrsta naseljava područje centralnog i istočnog SAD-a, Kubu i Meksiko (Hobbs, 1988). Ovom rodu pripada i relativno nedavno otkrivena invazivna strana vrsta u Europi, mramorni rak *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017). Dobio je ime „mramorni rak“ prema uzorku na tijelu (Slika 1) koji podsjeća na mramor (Martin i sur. 2010). Obično živi u plitkim vodama koje imaju smanjeno strujanje vode, te na mekanom supstratu kao što je mulj (Chucholl i Pfeiffer 2010).



**Slika 1.** Mramorni rak (izvor: <https://aquaticarts.com/collections/freshwater-crayfish/products/self-cloning-marmorkreb-crayfish-juveniles>)

Najprije se mramorni rak smatrao partenogenetskim oblikom vrste *Procambarus fallax*. Međutim u istraživanju provedenom 2010. godine predložen je status vrste za mramornog raka ukoliko zadovoljava kriterije koncepta vrste za organizme koje se nespolno razmnožavaju (Martin i sur. 2010), što je potvrđeno istraživanjem Vogt i sur (2015), te je mramorni rak odvojen kao zasebna vrsta, *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017).

Mramorni rak se razmnožava isključivo partenogenetski, te do sada nije pronađen mužjak mramornog raka (Seitz i sur. 2004; Jones i sur. 2009). Također pokušaj dobivanja mužjaka tretiranjem jaja muškim hormonima je bio neuspješan (Vogt 2007). Razmnožava se apomiktičkom partenogenezom (Martin i sur. 2007; Vogt i sur. 2008), što je oblik partenogenetskog razmnožavanja gdje oocite ne prolaze kroz mejozu (Martin i sur. 2015). Ono što ovakav način razmnožavanja omogućuje je uspostavljanje populacije pomoću samo jedne jedinke (Jones i sur. 2009). Zbog ove karakteristike, uz visok fekunditet, mramorni rak smatra se kao vrlo uspješna invazivna vrsta (Jones i sur. 2009).

U istraživanju iz 2015. godine, Martin i sur. otkrili su da je mramorni rak triploidan organizam, odnosno da ima tri seta kromosoma, a ne dva. Postojale su polemike da bi uzrok triploidnosti mogao biti križanje između vrste *P. fallax* i druge srodne vrste, međutim potrebno je izvršiti daljna istraživanja kako bi se ova hipoteza potvrdila ili odbacila (Martin i sur. 2015).

Mramorni rak je prvi put u Europi zabilježen krajem prošlog stoljeća u Njemačkoj, gdje se uzgajao kao akvaristička vrsta (Werner 1998). S obzirom da su sve današnje prirodne populacije mramornog raka klonovi onih iz akvaristike, vjeruje se da je u prirodna staništa pušten namjerno ili slučajno od strane akvarista (Faulkes i sur. 2012). Do danas, populacije mramornog raka u prirodi zabilježene su diljem Europe, primjerice u Češkoj, Hrvatskoj, Madagaskaru, Mađarskoj i Ukrajini (Lyko 2017), Rumunjskoj (Pârvulescu i sur. 2017), Japanu (Faulkes i sur. 2012), Estoniji (Ercoli i sur. 2019).

Mramorni rak je dobar modelni organizam (Buric i sur. 2013) zbog partenogenetskog načina razmnožavanja, dugo živi, omnivor je, ima visoku stopu fekunditeta i kraće generacijsko vrijeme u usporedbi sa ostalim deseteronožnim rakovima (Vogt i sur. 2008). Ono što ga čini pogodnim modelnim organizmom za ekotoksikološka istraživanja, odnosno za istraživanje utjecaja organskih zagađivala na slatkovodne beskralježnjake je nakupljanje zagađivala u tijelu (Funkhouser, 2014), što omogućuje praćenje utjecaja zagađivala na svim razinama biološke organizacije: od molekularne, stanične razine do razine organskih sustava i cijele jedinke. Koristeći različite koncentracije organskih zagađivala možemo pratiti dugotrajne posljedice zagađenja na rakove i ostale organizme prisutne u slatkovodnim ekosustavima, te ujedno pratiti njihov utjecaj na invazivni uspjeh u slučaju invazivnih stranih vrsta.

### 3. ORGANSKA ZAGAĐIVALA

Zagađivala dopijevaju u slatke vode različitim prirodnim putevima, kao što su vulkanske erupcije i raspadanje organizama (Schwarzenbach i sur. 2010), međutim u današnje vrijeme okoliš je pojačano opterećen organskim zagađivalima koji nastaju kao posljedica čovjekovih aktivnosti (Focazio i sur. 2008).

Zbog pojačane čovjekove upotrebe pesticida i industrijskih kemikalija, organska zagađivala lako dopijevaju u slatkovodne ekosustave. Kada dopiju u okoliš, neka organska zagađivala lako se razgrađuju prirodnim asimilacijskim procesima. Međutim veći rizik predstavljaju otporna organska zagađivala, kao što su pesticidi. Pesticidi su definirani kao toksične kemikalije koje su namjerno uvedene u okoliš s ciljem prevencije, uništavanja i smanjenja nepoželjnih štetočina. S obzirom da su insekticidi i herbicidi najviše korišteni, smatraju se najvažnijim skupinama pesticida (Hossain i Islam 2012). Pesticidi su iznimno rezistentni na razgradnju, stoga se mogu lako proširiti na velikoj geografskoj površini i akumulirati u tlo i sediment (Pal i sur. 2010). Mogu se zadržati u okolišu mjesecima ili čak godinama (Navratil i Minark 2005), stoga ih neciljani organizmi konzumiraju, te mogu izazvati akutne poremećaje kod neciljanih organizama (Barnes i Kolpin 2008). Zbog toga je od velike važnosti pratiti njihov utjecaj na rast i razvoj, mortalitet, ponašanje, histopatologiju te oksidativni stres neciljanih organizama kao što je primjerice mramorni rak.

U ovom radu razrađen je utjecaj tri organska zagađivala: dva herbicida prometrin i metazaklor i njegov metabolit metazaklor OA, te jedan insekticid cipermetrin. Odabrala sam ove spojeve zbog velike komercijalne upotrebe. Iako su odabrani spojevi insekticid i herbicidi, odnosno njihove ciljne skupine nisu rakovi, oni izazivaju razne promjene u staništu u kojem rakovi žive te mogu utjecati i na rakove kao neciljane organizme. U različitim radovima nakon izlaganja pojedinim spojevima praćeni su različiti parametri, što me navelo na sintezu ovih radova kako bi se proučio čitav spektar učinaka koje ovi spojevi izazivaju kod mramornog raka, od molekularne razine jedne jedinke, pa sve do utjecaja na cijelu populaciju mramornih rakova.



### 3.1. Utjecaj prometrina

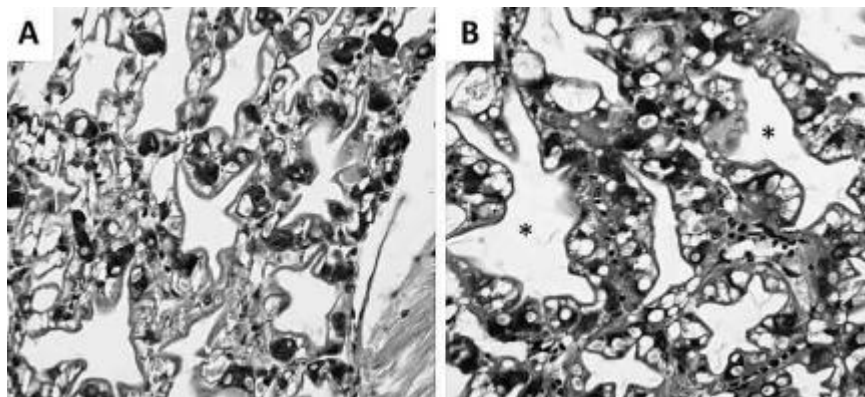
Prometrin [6-metilsulfanil-2-*N*,4-*N*-di(propan-2-il)-1,3,5-triazin-2,4-diamin] je organsko zagađivalo koje je prvi put registrirano kao herbicid u SAD-u 1964. godine (LeBaron i sur. 2008). Djeluje tako da inhibira fotosintezu, točnije lanac elektrona u određenim biljkama (Erickson i Turner 2002). Vrijeme poluraspada u tlu je 60 dana, ali višekratno godišnje nanošenje može produljiti aktivnost na 12 do 18 mjeseci. Međutim, zbog slabe apsorpcije u tlu, lako dospije do podzemnih voda gdje je vrijeme poluraspada do 500 dana (Jiang i sur. 2011). Prometrin se često koristi u Kini, Kanadi, Australiji te u SAD-u. Iako je njegovo korištenje zabranjeno u Europi (Zhou i sur. 2012), i dalje se može naći u podzemnim vodama zbog ilegalne upotrebe u poljoprivredi. U Grčkoj su u površinskim vodama detektirane koncentracije od 0.190 do 4.40  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Vryzas i sur. 2011), dok je u podzemnim vodama detektirana koncentracija od 1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Papadopoulou-Mourkidou i sur. 2004).

Unatoč tome što je prometrin herbicid, može štetno djelovati i na ostale organizme prisutne u vodenim ekosustavima. Stoga su Velisek i suradnici u 2014. godini ispitivali učinak letalnih i subletalnih doza prometrina na rane faze razvoja mramornog raka koristeći 53 dnevni test toksičnosti. U istraživanju je proučavan učinak 4 koncentracija prometrina: okolišna koncentracija u rijekama u Češkoj, te još 3 više koncentracije (140  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , 1 440  $\mu\text{g.l}^{-1}$  i 4 320  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ), a postojala je i kontrolna skupina koja nije bila izložena prometrinu. Tokom trajanja eksperimenta i nakon završetka praćene su promjene u rastu i histologiji kako bi se utvrdio utjecaj prometrina na mramornom raku.

Usporedivši sa kontrolnom skupinom, pri izlaganju jedinki okolišnoj koncentraciji prometrina, nije uočen negativan učinak na masu te stopu rasta, dok je kod svih viših koncentracija vidljiv negativan utjecaj na ove parametre. Ono što redukcija rasta može uzrokovati je odgođeno sazrijevanje i reprodukciju, te može biti reducirana mogućnost opskrbe hranom i kompeticija za prikladna staništa (Woltering 1984).

Pokazano je da kontrolne jedinice i jedinice izlagane okolišnoj koncentraciji imaju normalnu morfologiju hepatopankreasa, dok su kod jedinice koje su bile izlagane višim koncentracijama uočene dilatacije cjevčica tkiva (Slika 2), te generalno uništavanje tkiva koje je progresivno više izraženo pri višim koncentracijama. Hepatopankreas je u rakova najbitniji organ

za detoksifikaciju zagađivala, također stvara i izlučuje sve enzime potrebne u probavi. Promjene u hepatopankreasu uzrokovane su akumulacijom prometrina u stanicama samog organa.



**Slika 2.** Tkivo hepatopankreasa mramornog raka. A – kontrolna skupina; B – skupina izložena  $1\ 440\ \mu\text{g.l}^{-1}$  prometrina. Zvezdice (\*) ukazuju na dilatacije cjevčica. Slika je preuzeta i prilagođena prema Velisek i sur., 2014.

Promjene u tkivu škrge očituju se u dilataciji filamenata. Ove promjene mogle su se uočiti u svim izlaganim grupama neovisno o koncentraciji, s time da su češće bile prisutne kod jedinki koje su bile izložene višim koncentracijama.

Prema dobivenim rezultatima smatram da prometrin može predstavljati veliku opasnost mramornim rakovima u prirodi. Promjene u histopatologiji škrge vidljive su i kod jedinki koje su izlagane okolišnoj koncentraciji u rijekama u Českoj ( $0.51\ \mu\text{g.l}^{-1}$ ), što je 9 puta manje od maksimalne izmjerene koncentracije u površinskim vodama u Grčkoj (Vryzas i sur. 2011). Ovo nam sugerira da prometrin vjerojatno izaziva ovakve promjene kod svake jedinke mramornog raka u prirodi. Škrge su prvi organ koji preko vode dolazi u doticaj sa prometrinom i njemu sličnim spojevima. Oštećenja tkiva mogla bi utjecati na difuziju plinova, stoga mogu utjecati na preživljavanje jedinke u prirodi. Zbog toga što su histopatološke promjene vidljive i pri okolišnoj koncentraciji mogle bi služiti kao biomarker za monitoring pesticida u ranim fazama razvoja rakova.

S druge strane, dio promjena (smrtnost, stopa rasta, smanjenje mase te histopatologija hepatopankreasa) je bio uočen tek na jako visokim koncentracijama. Zbog nekontrolirane upotrebe prometrina (Velisek i sur. 2014) moguće je kako će u nekim slučajevima okolišne koncentracije ovog spoja biti znatno veće od onih pretpostavljenih u ovom istraživanju, te je time

moćuće i povećanje negativnih utjecaja prometrina na gore navedene karakteristike mramornog raka u prirodi. Mogući razlog za smanjenje stope rasta i smanjenje mase su zabilježene promjene hepatopankreasa pri višim koncentracijama. S obzirom da je hepatopankreas glavni energetska organ, oštećenja potencijalno mogu imati negativne posljedice za distribuciju energije u organizmu što posljedično može dovesti do negativnog učinka na rast i razvoj mramornog raka. Također ukoliko se smanji stopa rasta i jedinke imaju smanjenu masu, većina energije bi se preusmjerila na preživljavanje jedinke, stoga bi potencijalno došlo do smanjenja fekunditeta te u konačnici do smanjenja populacije. Nadalje zbog oštećenja tkiva hepatopankreasa potencijalno može doći do smanjene efikasnosti u detoksifikaciji zagađivala, zbog čega bi organska zagađivala u većoj mjeri utjecala na jedinku, pa moguća su i akutna oštećenja.

### 3.2. Utjecaj cipermetrina

Piretroidi su aktivni spojevi mnogih komercijalno dostupnih insekticida. Često se koriste u poljoprivredi, kućanstvu kao i u veterinarskoj medicini (Palmquist i sur. 2012). Piretroidi su sintetski oblik piretrina, s time da su piretroidi fotostabilniji i imaju smanjenu akutnu toksičnost za ljude, ali je insekticidna aktivnost dobro zadržana (Sparks 2013). Ubijaju kukce kada oni dođu u dodir s njima preko kutikule ili u slučaju konzumiranja tretiranih biljaka (Soderlund i sur. 2002). Postoje dvije skupine piretroida i obje djeluju na živčani sustav. Prva skupina djeluje tako da produljuje otvaranje natrijevih kanala u neuronima, točnije u membranama aksona. Druga skupina utječe na GABA receptore tako da blokira transport kloridnih iona u neuronima. U navedenoj drugoj skupini pripada jedan od najkorištenijih piretroida cipermetrin, [cijano-(3-fenoksifenil)metil]3-(2,2-dikloroetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat. Cipermetrin se koristi u veterinarskoj medicini kao zaštita kućnih ljubimaca od ektoparazita.

Posebno je važno istraživanje utjecaja piretroida u okolišu, te njihovog učinka na neciljane organizme, kao što su rakovi. Stoga su Lidova i sur. 2016. godine proveli istraživanje u kojem su se usredotočili na učinke subletalnih koncentracija insekticida Cyperkill 25 EC (čiji je osnovni sastojak cipermetrin) na oksidativni stres i antioksidativnu zaštitu juvenilnih jedinki mramornog raka. Uz kontrolnu skupinu postojale su dvije koncentracije insekticida ( $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  i  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Nakon izlaganja uzorci su korišteni za analizu SOD (superoksid dismutaza), GR (glutation reduktaza), GSH (reducirani glutacion) i TBARS (reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline).

Do oksidativnog stresa dolazi u slučajevima kada je produkcija ROS, reaktivnih oblika kisika veća od sposobnosti obrambenih antioksidativnih mehanizama (Lushchak 2011), dok u normalnim uvjetima u stanicama je produkcija i degradacija ROS u ravnoteži. Jedan od najčešće korištenih biomarkera za oksidativni stres je mjerenje lipidne peroksidacije, odnosno oksidacije lipida što rezultira produkcijom toksičnih aldehida i hidroperoksida (van der Oost i sur. 2003). U ovom slučaju oksidativni stres bio je mjeren metodom tiobarbiturne kiseline (TBARS metoda) koja procjenjuje razine malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije. Istraživanje je pokazalo da u tretiranim skupinama pri obe korištene koncentracije cipermetrina dolazi do

zmanjenih vrijednosti produkata lipidne peroksidacije što sugerira da se antioksidativni mehanizmi nisu iscrpili nakon izlaganja od 72 sata.

Enzimski antioksidativna zaštita prvenstveno je potrebna na mjestu na kojem nastaje najviše slobodnih radikala. Ponajprije u mitohondrijima, ali i u citosolu i u ekstracelularnom prostoru. Jedan od tih enzima je i superoksid dismutaza (SOD). To je enzim koji transformira superoksidne anione u molekule kisika i vodikovog peroksida i jedan je od najvažnijih primarnih enzimskih antioksidansa koji štiti stanicu (van der Oost i sur. 2003). Nadalje, glutation reduktaza (GR) je enzim koji konvertira oksidirani glutation u reduciranom obliku – GSH (van der Oost i sur. 2003). Reducirani glutation (GSH) je jedan od najbitnijih neenzimatskih antioksidansa koji sudjeluje u obrani stanica od štete oksidativnog stresa (Valavanidis i sur. 2006). U istraživanju je došlo do povećane aktivnosti SOD u skupini izloženoj višoj koncentraciji cipermetrina. Ovo je vjerojatno uzrokovalo smanjene vrijednosti produkata lipidne peroksidacije. U usporedbi sa kontrolnom skupinom došlo je do smanjenih razina GSH, a kod izloženih i kontrolnih skupina došlo je do smanjenje aktivnosti GR vjerojatno zbog smanjene koncentracije glutationa.

Mramorni rak se pokazao kao iznimno osjetljiv te prikladan organizam za istraživanje toksikoloških utjecaja piretroida. Izlaganje mramornog raka insekticidom Cyperkill 25 EC pokazalo je da piretroidi utječu na oksidativni stres te antioksidativne mehanizme u rakovima. Tretirane jedinke imale su niže vrijednosti produkata lipidne peroksidacije kao posljedica povećane aktivnosti SOD, stoga pri korištenim koncentracijama antioksidativni mehanizmi raka su i dalje efektivni odnosno aktivno odstranjuju slobodne radikale unatoč smanjenih razina GR i GSH. U prirodi bi moglo doći do drugačijeg ishoda zbog potencijalnog antagonističkog ili sinergističkog djelovanja drugih zagađivala prisutnih u okolišu (Escher i sur. 2020), te zbog toga što su moguće i dugoročne i kratkoročne promjene u koncentracijama cipermetrina prisutnog u okolišu (Benbrook 2016). Pri dugoročnom izlaganju jedinki ovim spojevima u prirodi moguće je povećanje oksidativnog stresa, te kao posljedica veće koncentracije ROS došlo bi do oštećenja DNA i promjene metabolizma proteina, što bi rezultiralo mutacijama i promjenom aktivnosti enzima.

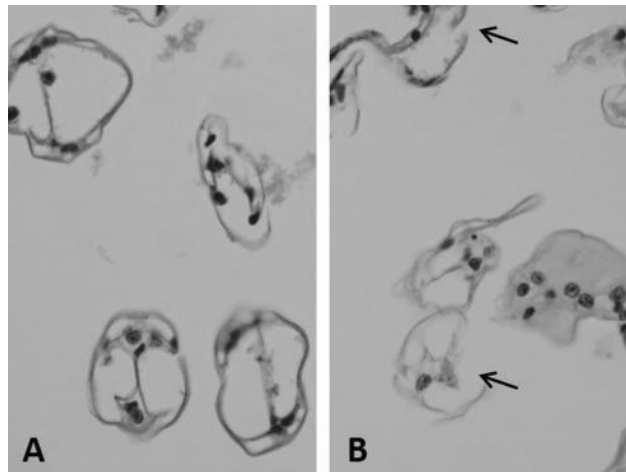
### 3.3. Utjecaj metazaklora i metabolita metazaklor OA

Metazaklor [2-kloro-*N*-(2,6-dimetilfenil)-*N*-(pirazol-1-ilmetil)acetamid] je često korišteni herbicid. Djeluje na način da inhibira stvaranje dugolančanih masnih kiselina koje su nužne u procesu diobe stanice (Böger 2003). Vrijeme poluraspada u tlu je od 5 do 30 dana, pri čemu nastaju oksanilična kiselina (OA), etansulfonska kiselina (ESA) i drugi derivati (Lewis 2016). S obzirom da se transformacijski produkti slabo adsorbiraju, dolazi do mobilnosti, pa smatra se da su metaboliti metazaklora jedni od češćih zagađivača slatkih voda (Lewis 2016). U površinskim vodama u Njemačkoj detektirane su koncentracije metazaklora u rasponu od  $0.1 \mu\text{g.l}^{-1}$  do  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Weber i sur. 2018). Što se tiče metabolita, detektirane su koncentracije od  $1.8 \mu\text{g.l}^{-1}$  za metazaklor OA (Weber i sur. 2018). Metazaklor i njegovi metaboliti predstavljaju veliki rizik za vodene ekosustave. Kod sisavaca, osim akutne toksičnosti potvrđen je i kancerogeni utjecaj.

Iako rakovi nisu ciljani organizmi na kojima metazaklor i njegovi metaboliti djeluju, visoke koncentracije u vodenim ekosustavima mogu štetno utjecati. Stoga su Velisek i Kauba u 2020. god. proveli istraživanje u kojem ispituju učinke okolišnih koncentracija metazaklora i metabolita metazaklor OA na mortalitet, rast, ponašanje i histopatologiju mramornog raka. Uz kontrolnu skupinu postojale su po dvije koncentracije za metazaklor ( $3.2 \mu\text{g.l}^{-1}$  i  $22 \mu\text{g.l}^{-1}$  - okolišna koncentracija) i metazaklor OA ( $3.2 \mu\text{g.l}^{-1}$  - okolišna koncentracija i  $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ ).

U usporedbi sa kontrolnom skupinom, mortalitet izloženih jedinki svim koncentracijama bio je značajno povišen, stopa rasta je bila smanjena i došlo je do promjena u aktivnosti mramornog raka, što ukazuje na vrlo jak učinak ovog pesticida koji može biti letalan za neciljane slatkovodne organizme. Smanjena stopa rasta izloženih jedinki ukazuje na moguće preusmjerenje energije na detoksifikaciju, te povećano ulaganje energije u antioksidativnu zaštitu, umjesto na rast i razvoj. Nadalje, istraživanje je pokazalo značajne promjene u ukupnoj udaljenosti koju jedinke prijeđu unutar xx vremena te brzini kretanja. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, tretirane jedinke su se kretale manje i sporije. Rakovi jako ovise o obradi širokog spektra vizualnih i kemijskih signala s odgovarajućim odgovorom u obliku bijega (Kubec 2019). U prisutnosti predatora sporiji odgovor može biti fatalan osobito za rakove u ranim fazama razvoja.

Kao dobar indikator kvalitete vode, te utjecaja različitih tvari često se koristi tkivno stanje škrga (Mallatt 1985). Ukoliko dođe do oštećenja tkiva može doći do različitih poremećaja, od otežane difuzije plinova, pa sve do inhibicije disanja (Mallatt 1985). Kod tretiranih rakova došlo je do abnormalnosti u tkivu škrga, odnosno do oštećenja branhijalne strukture (Slika 3), pri čemu jeviša koncentracija spojeva uzrokovala veću učestalost oštećenja.



**Slika 3.** Tkivo škrga mramornog raka. A – kontrolna skupina sa urednom branhijalnom strukturom; B – skupina izložena  $22\mu\text{g.l}^{-1}$  metazaklorom OA. Strelice ukazuju na oštećenje tkiva. Preuzeto i prilagođeno prema Velisek i Kauba, 2020.

Razlike u mortalitetu, stopi rasta, ponašanju i histopatologiji izloženih jedinki potvrđuju negativan utjecaj herbicida na rakove. Pri tome veći učinak ima metabolit metazaklora, metazaklor OA koji se teško adsorbira, odnosno ima slobodu mobilnosti u vodenim ekosustavima. Utjecaj ovih spojeva mogao bi predstavljati problem za populacije u prirodi. Pri svim korištenim koncentracijama ovih spojeva došlo je do povećane stope mortaliteta. Na određenim mjestima u prirodi izmjerena je puno viša koncentracija od koncentracija korištenih u eksperimentu, stoga bi dugoročno izlaganje tim povećanim koncentracijama potencijalno moglo dovesti do drastičnog pada populacija mramornog raka izloženih ovom pesticidu u prirodi, s obzirom da stopa mortaliteta progresivno raste pri višim koncentracijama. Međutim mortalitet dijela jedinki će i dalje omogućiti opstanak populacije zato jer je vrsta partenogenetska. Kod tretiranih jedinki je došlo i do smanjene stope rasta. Preusmjerenje energije na preživljavanje ili detoksifikaciju moglo bi dati ovakav ishod. Stoga bi jedinke manjeg rasta u populaciji mogle biti izložene većem spektru predatora, te u konačnici bi moglo doći do smanjenja populacije. Također zbog drugačijeg iskorištavanja energije moglo bi doći i do smanjenja fekunditeta, što bi

ponovo utjecalo negativno na brojnost populacije. Nadalje, prateći ponašanje uočeno je da tretirane jedinke imaju smanjenu lokomociju. Ovakav bi odgovor u prirodi povećao izloženost rakova predatorima. Zakašnjele reakcije mogle bi uzrokovati povećani broj ozljeda ili može doći do povećane stope smrtnosti. U konačnici najveći problem bi mogle predstavljati promjene u tkivu škrge kod tretiranih jedinki. Zbog direktnog kontakta sa zagađenom vodom, dolazi do oštećenja branhijalne strukture škrge. Takva oštećenja mogu utjecati na efikasnost difuzije plinova, te u konačnici bi opstanak populacije mogao biti ugrožen ako dođe do potpune inhibicije disanja.



## 4. ZAKLJUČAK

Gospodarski razvoj svijeta uvjetovao je porast upotrebe raznih proizvoda koji se sve češće mogu naći u okolišu i podzemnim i površinskim vodama. Stoga, organska zagađivala mogu predstavljati opasnost za vodene ekosustave i imati negativan utjecaj na organizme koje žive u istima. Utjecaj organskih zagađivala većinom je istraživan na kralježnjacima, dok se o utjecaju na beskralježnjake malo zna. S obzirom da beskralježnjaci, uključujući i rakove predstavljaju ključne karike vodenih ekosustava bitno je poznavati potencijalni rizik kojem su izloženi u svojem prirodnom staništu, kako ne bi došlo do poremećaja cijele hranidbene mreže.

Mramorni rak je odličan modelni organizam za ekotoksikološka istraživanja. Zbog partenogenetskog razmnožavanja i jednostavnog uzgoja u laboratoriju pogodan je za mnoga ostala biološka istraživanja. Uz to je uspješna invazivna strana vrsta, pa ovakva istraživanja nam pomažu u sagledavanju invazivnog uspjeha ove vrste.

U navedenim istraživanjima praćen je utjecaj herbicida i insekticida na rakove. Iako oni nisu ciljani organizmi, pokazalo se da prometrin, cipermetrin, te metazaklor i njegov metabolit metazaklor OA utječu na mortalitet, rast i razvoj, lokomociju, histopatologiju i oksidativni stres mramornog raka. Promjene su kod nekih parametara uočene već i kod okolišnih koncentracija spojeva. Zbog velikog antropogenog utjecaja na staništa u kojem ove životinje žive, lako može doći do povećavanja koncentracija organskih zagađivala, te u konačnici narušavanja vodenih ekosustava. Nadalje, bitno je naglasiti da su životinje izlagane individualnim spojevima, dok je u prirodi situacija drugačija. Interakcije različitih zagađivala mogu znatno povećati negativan efekt, stoga potrebno je raditi kontrolirane eksperimente gdje se prati utjecaj mješavina više spojeva u kombinaciji s izlaganjem jedinki *in situ*, u staništu u kojemu je vrsta već prisutna i za koje je poznato kako su koncentracije ciljanih zagađivala povećane, kako bi se povećala saznanja o potencijalnom međudjelovanju različitih zagađivala u prirodi. U konačnici smatram da su ovakva istraživanja od velike važnosti kako bi otkrili kakav je utjecaj čovjeka, ne samo na rakove, već na ekosustave kao cjelinu.

## 5. LITERATURA

- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T., Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater. *Science of the total environment*, 402(2-3), 192-200.
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 3.
- Böger, P. (2003). Mode of action for chloroacetamides and functionally related compounds. *Journal of Pesticide Science*, 28(3), 324-329.
- Buric, M., Kouba A., Machova J., Mahovska I., Kozak P. (2013). Toxicity of the organophosphate pesticide diazinon to crayfish of differing age. *Int J Environ Sci Technol*. 10: 607–610.
- Chucholl, C., Pfeiffer, M. (2010): First evidence for an established Marmorkrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) population in Southwestern Germany, in syntopic occurrence with *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). *Aquatic Invasions*, 5(4), 405–12.
- Crehuet, M., Alcorlo, P., Bravo-Utrera, M. A., Baltanás, A., Montes, C. (2007). Assessing the trophic ecology of crayfish: a case study of the invasive *Procambarus clarkii*. *U Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats* (pp. 559-576).
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O. i sur. (2006): Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81, 163–182.
- Ercoli, F., Kaldre, K., Paaver, T., Gross, R. (2019). First record of an established marbled crayfish *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017) population in Estonia. *BioInvasions Records*, 8(3).

- Erickson, W., Turner, L. (2002). Prometryn analysis of risks to endangered and threatened Salmon and Steelhead. Environmental Field Branch, Office of Pesticide Programs, 368, 71.
- Escher, B. I., Stapleton, H. M., Schymanski, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367(6476), 388-392.
- Faller, M., Harvey, G. L., Henshaw, A. J., Bertoldi, W., Bruno, M. C., England, J. (2016). River bank burrowing by invasive crayfish: spatial distribution, biophysical controls and geomorphic significance. *Science of the Total Environment*, 569, 1190-1200.
- Faulkes, Z., Ferial, T. P., Muñoz, J. (2012): Do Marmorkrebs, *Procambarus fallax f. virginalis*, threaten freshwater Japanese ecosystems? *Aquatic Biosystems*, 8, 13.
- Filipova, L., Petrusek, A., Matasova, K., Delaunay, C., Grandjean, F. (2013). Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in populations of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: evaluating the threat to native crayfish. *PLoS One*, 8(7), e70157.
- Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Thurman, M. E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—II) Untreated drinking water sources. *Science of the total Environment*, 402(2-3), 201-216.
- Funkhouser, M. (2014). The toxicological effects of Perfluorooctane sulfonate (PFOS) on a freshwater gastropod, *Physa pomilia*, and a parthenogenetic decapod, *Procambarus fallax f. virginalis* (Doctoral dissertation).
- Hossain, M. M., Islam, K. N., Rahman, I. M. (2012). An overview of the persistent organic pollutants in the freshwater system. In *Ecological Water Quality-Water Treatment and Reuse*. IntechOpen.
- Huber, M. G. J., Schubart, C. D. (2005): Distribution and reproductive biology of *Austropotamobius torrentium* in Bavaria and documentation of a contact zone with

alien crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 759-776.

Jiang, L., Ma, L., Sui, Y., Han, S. Q., Yang, H. (2011). Mobilization and plant accumulation of prometryne in soil by two different sources of organic matter. Journal of Environmental Monitoring, 13(7), 1935-1943.

Jones, J. P. G., Rasamy, J. R., Harvey, A., Toon, A., Oidtmann, B., Randrianarison, M. H., i sur. (2009). The perfect invader: A parthenogenic crayfish poses a new threat to Madagascar's freshwater biodiversity. Biological Invasions, 11(6), 1475–82.

Johnson, M. F., Rice, S. P., Reid, I. (2011). Increase in coarse sediment transport associated with disturbance of gravel river beds by signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). Earth Surface Processes and Landforms, 36(12), 1680-1692.

Kubec, J., Hossain, M. S., Grabicová, K., Randák, T., Kouba, A., Grabic, R., Buřič, M. (2019). Oxazepam alters the behavior of crayfish at diluted concentrations, venlafaxine does not. Water, 11(2), 196.

LeBaron, H. M., McFarland, J. E., Burnside, O. C (2008). The Triazine Herbicides, 50 Years Revolutionizing Agriculture. Elsevier.

Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 22(4), 1050-1064.

Lidova, J., Stara, A., Kouba, A., Velisek, J. (2016). The effects of cypermethrin on oxidative stress and antioxidant biomarkers in marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). Neuroendocrinol. Lett., 37, 53-59.

Lodge D. M., Taylor C. A., Holdich D. M., Skurdal J. (2000). Non-indigenous crayfishes threaten North American freshwater biodiversity: Lessons from Europe. Fisheries, 25, 7-20.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic toxicology, 101(1), 13-30.

- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630-648.
- Martin, P., Thonagel, S., Scholtz, G. (2015). The parthenogenetic Marmorkrebs (Malacostraca: Decapoda: Cambaridae) is a triploid organism. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54(1), 13-21.
- Martin, P., Dorn, N. J., Kawai, T., van der Heiden, C., Scholtz, G. (2010). The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870). *Contributions to Zoology*, 79(3), 107–118.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G. (2007). The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften*, 94, 843-846.
- Navratil, T., Minarik L., 2005 Trace elements and contaminants, U: V. Cilek and R. H. Smith (Eds.), *Encyclopedia of Life Support System*, Vol. IV, pp. 1184–1213.
- NN 80/13 Zakon o zaštiti prirode Republike Hrvatske, Narodne novine 80, 2013.
- Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the total environment*, 408(24), 6062-6069.
- Palmquist, K., Salatas, J., Fairbrother, A. (2012). Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology. *Insecticides-advances in integrated pest management*, 251-278.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D. G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P. (2004). The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. *Sci. Total Environ.* 321: 127–146.
- Pârvulescu, L., Togor, A., Lele, S. F., Scheu, S., Șinca, D., Panteleit, J. (2017). First established population of marbled crayfish *Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis* (Decapoda, Cambaridae) in Romania. *BioInvasions Record*, 6(4).

- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U. Harzsch, S., Maier, G. (2004). Ontogeny of the Marmorcrebs (Marbled crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *Journal of Experimental Zoology*, 303A, 393-345.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicol.* 171: 3–59.
- Söderbäck, B. (1991). Interspecific dominance relationship and aggressive interactions in the freshwater crayfishes *Astacus astacus* (L.) and *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Canadian Journal of Zoology*, 69(5), 1321-1325.
- Sparks, T. C. (2013). Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(1), 8-17.
- Stara, A., Kouba, A., Velišek, J. (2014). Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed research international*, 2014.
- Stara, A., Steinbach, Ch., Wlasow, T., Gomulka, P., Ziemok, E., Machova, J., Velisek, J. (2013). Effect of zeta-cypermethrin on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuroendocrinol Lett.* 34 S. 2: 37–42.
- Stara, A., Machova, J., Velisek, J. (2012). Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuroendocrinol Lett.* 33 S. 3: 130–135.
- Strayer, D. L., Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of North American Benthological Society*, 29(1), 344–358.
- Strayer, D. L. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of North American Benthological Society*, 25, 271-287.
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., Von Gunten, U., Wehrli, B. (2010). Global water pollution and human health. *Annual review of environment and resources*, 35, 109-136.

- Taylor, C. A. (2002). Taxonomy and conservation of native crayfish stocks. U: Holdich, DM (ed.) Biology of freshwater crayfish.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Safe.* 64: 178–189.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 13: 57–149.
- Velisek, J., Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., Kouba, A. (2020). Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
- Velisek, J., Stara, A., Koutnik, D., Zuskova, E., Kouba, A. (2014). Effect of prometryne on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Neuroendocrinol Lett*, 35(Suppl 2), 93-98.
- Velisek, J., Kouba, A., Stara, A. (2013). Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Lett.* 34 S. 2: 31–36.
- Velisek, J., Stara, A., Machova, J., Dvorak, P., Zuskova, E., Svobodova, Z. (2012a). Simazin toxicity in environmental concentration on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuroendocrinol Lett.* 33 S. 3: 90–95.
- Vogt, G., Falckenhayn, C., Schrimpf, A., Schmid, K., Hanna, K., Panteleit, J., et al. (2015). The marbled crayfish as a paradigm for saltational speciation by autopolyploidy and parthenogenesis in animals. *The Company of Biologists Ltd: Biology Open*, 4, 1583-1594.
- Vogt, G., Huber, M., Thiemann, M., van den Boogaart, G., Schmitz, O. J., Schubart, C. D. (2008). Production of different phenotypes from the same genotype in the same environment by developmental variation. *Journal of Experimental Biology*, 211, 510–523.

Vogt, G. (2007). Exposure of the eggs to 17 $\alpha$ -methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish (Marmorkrebs). *Aquatic Toxicology*, 85, 291-296.

Vryzas, Z., Alexoudisa, C., Vassilioua, G., Galanisa, K., Papadopoulou-Mourkidoub, E. (2011). Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotox Environ Safe*. 74: 174–181.

Weber, G., Christmann, N., Thiery, A. C., Martens, D., Kubiniok, J. (2018). Pesticides in agricultural headwater streams in southwestern Germany and effects on macroinvertebrate populations. *Science of the Total Environment*, 619, 638-648.

Zhou, J., Hu, F., Jiao, J., Liu, M., Li, H. (2012). Effects of bacterial-feeding nematodes and prometryne-degrading bacteria on the dissipation of prometryne in contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 12(4), 576-585.

<https://aquaticarts.com/collections/freshwater-crayfish/products/self-cloning-marmorkreb-crayfish-juveniles> (pristupljeno 28.06.2020. god.)



## 6. SAŽETAK

Zagađenje slatkovodnih ekosustava predstavlja veliki problem diljem svijeta. Herbicidi i insekticidi česti su zagađivači u površinskim i podzemnim vodama, stoga predstavljaju veliki rizik za neciljanje organizme poput rakova. Tri odvojena eksperimenta proučavala su učinke prometryna, cipermetrina i metazaklora i njegovog metabolita metazaklora OA na mramornom raku *Procambarus virginalis*. Kronično izlaganje rakova prometrynu utjecalo je na mortalitet, stopu rasta i histologiju. Neke su promjene primjećene kod većih koncentracija, ali histopatološke promjene škrge primjećene su i kod rakova izloženih okolišnim koncentracijama. Nadalje, izlaganje rakova cipermetrinu ukazalo je da cipermetrin izaziva oksidativni stres i poremećaje antioksidativnih sustava rakova. Konačno, uočene su razlike u mortalitetu, stopi rasta, ponašanju, kao i promjene u tkivu škrge nakon izlaganja rakova okolišnim koncentracijama metazaklora i njegovog metabolita metazaklora OA. Zaključno, sve studije ukazale su na negativne učinke organskih zagađivala na rakove.

## 7. SUMMARY

Pollution of freshwater ecosystems is a serious problem worldwide. Herbicides and insecticides are frequent pollutants in surface and groundwaters and they propose a major risk to non-target organisms, such as crayfish. The three separate experiments studied the effects of prometryne, cypermethrin and metazachlor and its metabolite metazachlor OA, respectively, on the marbled crayfish *Procambarus virginalis*. Chronic exposure of prometryne on early life stages of crayfish has affected their mortality, growth rate, and histology. Some of the changes were observed only at higher exposures, but histopathological changes in gills were observed also in crayfish exposed to environmental concentrations. Furthermore exposure of cypermethrin suggested that cypermethrin causes oxidative stress and also disruption of antioxidant systems in crayfish. Lastly, differences in mortality, growth, behaviour, as well as minimal alterations in gill tissue were observed following exposure to environmentally relevant concentrations of metazachlor and metazachlor OA. In conclusion, all studies suggested that organic pollutants have a negative effect on the marbled crayfish.