

UTJECAJ TEMPERATURE I PESTICIDA NA IZLIJEGANJE CRVENOG MUKAČA, *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761.)

doc. dr. sc. Olga Jovanović Glavaš
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
u Osijeku
Cara Hadrijana 8/A, Osijek, Hrvatska,

doc. dr. sc. Željka Lončarić
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
u Osijeku
Cara Hadrijana 8/A, Osijek, Hrvatska
e-mail: zloncaric@biologija.unios.hr

Vodozemci su prepoznati kao globalno najugroženija skupina kralježnjaka, a jedan od uzroka je primjena različitih ksenobiotika kao što su pesticidi. U ovom radu istražen je utjecaj različitih pesticida na razvoj jaja crvenog mukača, *Bombina bombina*. Korišteni su dimetoat, pirimifos-metil i glifosat, pri različitim temperaturama. Promatrana je dinamika izlijeganja izloženih jaja pri temperaturama od 8 °C, 12 °C, 18 °C, 25 °C i 30 °C te je uspoređena s kontrolnom skupinom. Temperatura od 8 °C je bila preniska za embrionalni razvoj crvenog mukača, neovisno o tretmanu. Pri temperaturi od 12 °C, jaja tretirana pirimifos-metilom su se izlegla prije kontrolne skupine i skupine izložene dimetoatu. Pirimifos-metil i dimetoat su pokazali najjače djelovanje na embrionalni razvoj pri temperaturi od 30 °C, gdje je došlo do njegovog produljenja. Nadalje, ovo istraživanje je potvrdilo negativno djelovanje glifosata na embrionalni razvoj žaba koji je ranije zabilježen na drugim vrstama vodozemaca, te se niti jedno jaje iz ove skupine nije izleglo.

Ključne riječi: vodozemci, dimetoat, pirimifos-metil, glifosat, embrionalni razvoj

1. UVOD

Vodozemci su vrlo osjetljivi na promjene u okolišu (npr. onečišćenje) te se zbog toga često koriste kao indikatorska skupina (npr. Hecnar i M'Closkey, 1996.; Welsh i Ollivier, 1998.; Hayes i dr., 2002.). Najosjetljivija su skupina kralježnjaka te je gotovo trećina vrsta ugrožena (Blaustein i dr., 1994.; Kiesecker i dr., 2001.; Stuart i dr., 2004.; Wake i Vredenburg, 2008.; Collins i Crump, 2009.; Wren i dr., 2015.). Collins (2010.) navodi glavne uzroke smanjenja brojnosti vodozemaca te ih dijeli u nekoliko skupina, od kojih su jedna skupina onečišćujuće tvari. U tu skupinu se ubrajaju postojeće organske onečišćujuće tvari (POPs-ovi, engl. *Persistent Organic Pollutants*), teški metali i radionuklidi (NCP, 2013). POPs-ovi između ostalog uključuju pesticide, koji mogu djelovati na vodozemce na različite načine, npr. kao endokrini disruptori, mogu uzrokovati malformacije ili mortalitet, te promjene u ponašanju (Hayes i dr., 2002.;

Sparling, 2003.; Katzenberger i dr., 2014.). Djelovanje pojedinog pesticida obično ovisi o vrsti (Berrill i dr., 1995.; Bishop i dr., 2010.), no također ovisi i o okolišu (Relyea i Hoverman, 2006.; Relyea i Diecks, 2008).

Organofosforni pesticidi, u koje se ubrajaju i dimetoat i pirimifos-metil, su često primjenjivani u različite svrhe (poljoprivreda, industrija, medicina) i zbog toga mogu djelovati ne samo na tlo, već i na različita vodna tijela u koja mogu dospjeti npr. procjeđivanjem iz tla ili površinskim ispiranjem (Rovedatti i dr., 2001.; Anderson i dr., 2003.). Dimetoat se koristi u kontroli raznih štetnika poput predstavnika Aphididae, Coleoptera i Lepidoptera. Kod vodozemaca, dokazan je utjecaj dimetoata na odgađanje metamorfoze, smanjenje rasta te mortalitet kod punoglavaca (Mizgireuv i dr., 1984.; Sayim i Kaya, 2005.). Pirimifos-metil je fumigant koji se koristi kao insekticid širokog spektra u kontroli brojnosti kukaca i grinja u raznim objektima (trgovine, štale, industrijske i

kućne prostorije). Unatoč širokoj primjeni, u malom broju istraživanja je ispitano njegovo djelovanje na neciljne organizme. U tom kontekstu, njegovo djelovanje na vodozemce je slabo istraženo (npr. Onadeko i Amaeze, 2015.), no postoje neki podaci za druge vodene organizme kao što su ribe (npr. gupiji, atlantski losos; Lawal i Samuel, 2010.; Berntssen i dr. 2021.). S druge strane, oba pesticida su pokazala toksični učinak na različite skupine, kao što su ptice, pčele i gujavice (Westlake i dr., 1981.; Ghini i dr. 2004.).

Glifosat je neselektivni fosfonoglicinski herbicid za kojeg se smatra da je blago toksičan za nekoliko vrsta vodozemaca (USEPA, 2004.). No, čak su i subletalne doze pokazale učinak na populacije vodozemaca (Relyea, 2004., 2009.). Smatra se da je glifosat umjereno toksičan za ptice, većinu vodenih organizama, gujavice i pčele (Ayooda, 2008.; Langiano i Martinez, 2008.). Osim što je aktivna tvar glifosata toksična, glifosat se komercijalno koristi u kombinaciji s različitim pomoćnim tvarima, surfaktantima, emulgatorima ili otapalima koji povećavaju toksičnost samog pesticida (Relyea i Jones, 2009.).

Na populacije vodozemaca između ostalog djeluju i klimatske promjene (Pounds, 2001.; Pounds i dr., 2006.) koje uzrokuju promjene u početku sezone razmnožavanja (Beebee, 1995.; Blaustein i dr., 2001.), kao i količine jaja (Hartel, 2008). Općenito, temperatura je jedan od najvažnijih abiotičkih čimbenika koji djeluju na životni ciklus vodozemaca i njezino djelovanje na embrionalni razvoj je proučavano još od kraja 19. i početka 20. stoljeća (npr. Hertwig, 1898.; King, 1903.). Promjene okolišne temperature mogu uzrokovati dodatni stres kod organizama te takav okolišni stres može djelovati i na ostale procese u organizmu, kao što je izloženost različitim ksenobiotičkim, poput pesticida. Takvo istraživanje je proveo Broomhall (2004.) koji je ispitivao međudjelovanje temperature i pesticida na vodozemce te je pokazao da temperatura pri kojoj se razvijaju jaja utječe na podložnost djelovanju pesticida u kasnijim razvojnim fazama.

Crveni mokač, *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761.) je široko rasprostranjena europska vrsta, no unatoč tome, brojnost njihovih populacija u Hrvatskoj se smanjuje, ponajviše zbog uništavanja staništa (Jovanović i Jelić, 2015.). Uvršten je na Dodatak II. Bernske Konvencije i Dodatke II. i IV. Europske Direktive o Staništima. Također, zaštićen je u brojnim zemljama, uključujući i Hrvatsku (Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama, NN 144/13, 73/16), te je uvršten i na Crveni popis (Agasyan i dr., 2009.; Jelić i dr., 2015.).

Do danas je vrlo mali broj istraživanja djelovanja pesticida proveden na crvenom mokaču (npr. trifluralin i izoproturon; Greulich i Pflugmacher, 2004.; Sayim, 2010.), naglasak je bio na istraživanju punoglavaca, no pesticidi koje smo mi koristili, prethodno nisu istraživani na ovoj vrsti.

U ovom radu istraženo je međudjelovanje dvaju čimbenika, izloženosti pesticidima i različitoj temperaturi,

na razvoj jaja crvenog mokača i vremena potrebnog za njihovo izlijeganje. Korištena su tri pesticida: dimetoat, pirimifos-metil i glifosat te je praćena dinamika njihovog izlijeganja kao i konačna izležljivost. U kontekstu klimatskih promjena koje su danas sve prisutnije, od iznimne je važnosti razumjeti povezanost između temperature i mogućih negativnih posljedica djelovanja pesticida na neciljne vrste, kao što je crveni mokač, kako bismo ih mogli na vrijeme zaštititi.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Skupljanje jaja i postavljanje pokusa

Nakupine od 30 vijabilnih jaja crvenog mokača prebrojane su i odvojene isti dan kada su i položena. Svaka nakupina stavljena je u zasebnu posudu (volumena 800 ml) u 500 ml odstajale vodovodne vode (kontrolna skupina) ili u otopinu pesticida. Zasebno je ispitivano djelovanje tri različita pesticida: dimetoata, pirimifos-metila i glifosata, te je promatran utjecaj jednokratnog izlaganja jaja crvenog mokača na brzinu razvoja jaja i izlijeganja punoglavaca te ukupan broj izlegnutih punoglavaca. Eksperimentalne otopine su pripremljene prvi dan i eksperimentalni medij nije mijenjan tijekom cijelog trajanja pokusa (ukupno 16 dana), odnosno do izlijeganja svih vijabilnih jaja (do trenutka kada su dosegli Gosnerov razvojni stadij između 20 i 22 te postali slobodnoplivajući punoglavci; Gosner, 1960.). Jaja u kontrolnoj skupini su se razvijala u odstajaloj vodovodnoj vodi koja također nije mijenjana tijekom cijelog trajanja pokusa.

Utjecaj izlaganja jaja pesticidima u usporedbi s kontrolnom skupinom, promatran je pri pet različitim temperaturama: 8 °C, 12 °C, 18 °C, 25 °C i 30 °C. Utjecaj djelovanja pesticida ispitivan je u tri replikata po 30 jaja, za svaku temperaturu i pesticid (odnosno 15 posuda za svaki pesticid), dok je kontrolna skupina postavljena u pet replikata za svaku temperaturu. Sve posude su postavljene u klima-komore uz prisutnost prirodnog osvjetljenja. Posude su prozračivane svaki dan te je prebrojavan broj izlegnutih punoglavaca.

2.2. Pesticidi

U istraživanju su korišteni sljedeći pesticidi: Chromgor 40 (Chromos Agro d.d., Zagreb, Croatia), preparat dimetoata (400 g/L aktivne tvari); Actellic 50 EC (Syngenta Agro d.o.o., Zagreb), preparat pirimifos-metila (500 g/L aktivne tvari); Glyfos (Cheminova A/S, Zagreb, Croatia), preparat glifosata (N-(fosfonometil)glicin 360 g/L i sol izopropilamina 480 g/L; alkilamin etoksilat < 10 % surfaktanta). Primijenjene su koncentracije od 1 mg aktivne tvari (AT)/L dimetoata, 1,25 mg AT/L pirimifos-metila i 10,8 mg AT/L N-(fosfonometil) glicina i 14,4 mg AT/L soli izopropilamina (ukupno 25,2 mg AT/L). Ove koncentracije odabrane su na temelju prethodnih istraživanja na različitim vodenim organizmima (npr. kalifornijskoj pastrvi, šaranu, velikoj vodenbuhi obzirom da podaci za vodozemce ne postoje za sve istraživane pesticide). Korištene su koncentracije testirane u drugim

istraživanjima, a uvijek su manje od 48-satnih LC_{50} (npr. Jayawardena i dr., 2011.; Mann i Bidwell, 1999.). LC_{50} (srednja smrtna koncentracija) je statistički izračunata koncentracija nekog spoja koja uzrokuje smrt 50 % testirane populacije u promatranom vremenu. Predstavlja jedan od temeljnih toksikoloških parametra koji služe u procjeni relativne toksičnosti različitih kemikalija te omogućuje usporedbu njihove akutne toksičnosti.

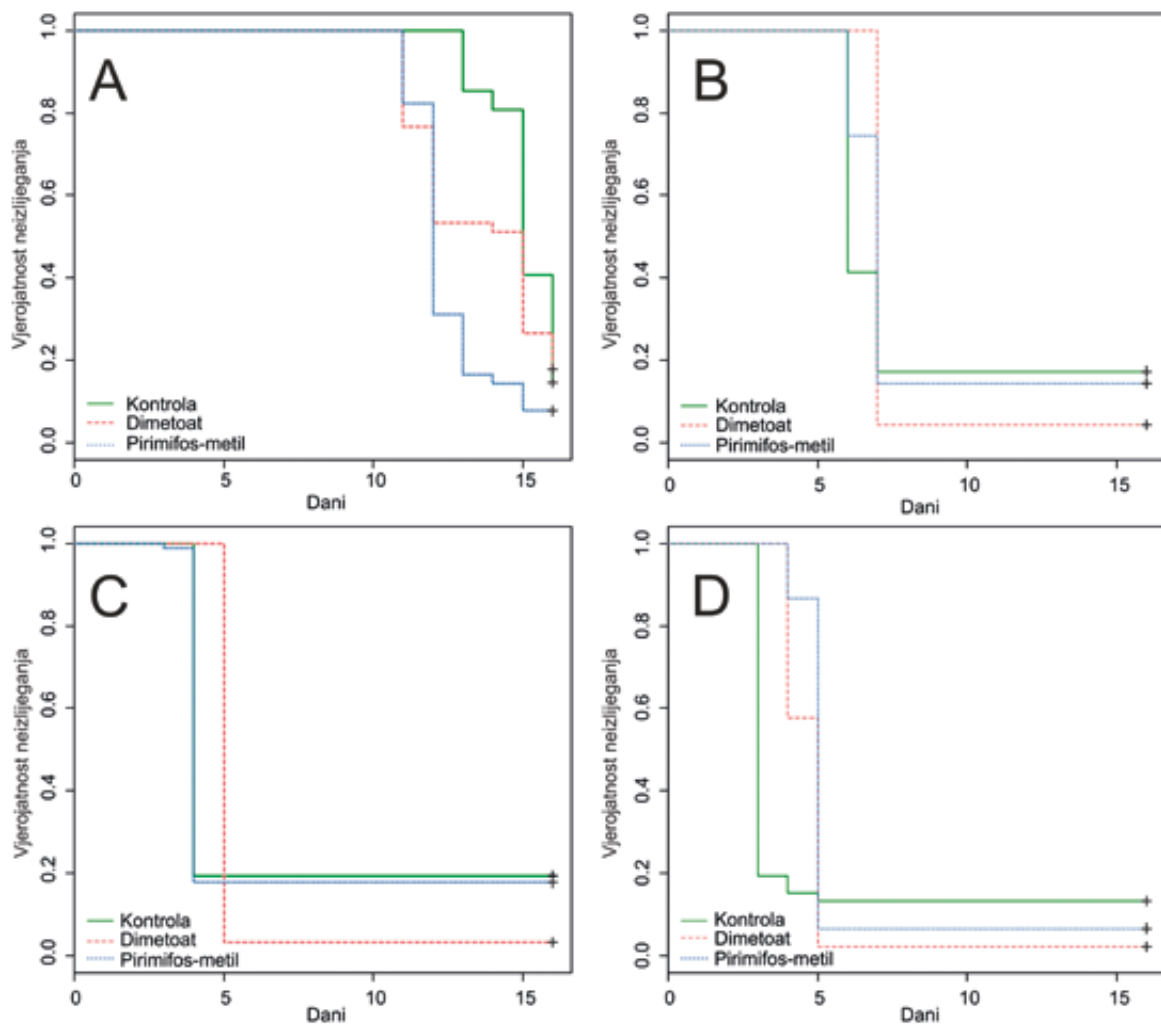
2.3. Statistička analiza

Analiza podataka i grafičko prikazivanje podataka napravljeni su pomoću R-a, inačice 3.2.2, jezika otvorenog koda i okruženja za statističko računanje i grafiku (R Development Core Team 2020.). Prije analize provjerena je distribucija podataka pomoću Shapiro-Wilkova testa (Shapiro i Wilk, 1965.). Budući da podaci nisu slijedili normalnu raspodjelu, proveden je neparametarski Kruskal-Wallisov test (Hollander i Wolfe, 1973.) kako bi se utvrdili učinci pesticida na uspješnost izlijevanja punoglavca između različitih tretmana (tj. % izlegnutih punoglavca na kraju eksperimenta). Za utvrđivanje uspješnosti izlijevanja između različitih tretmana,

nakon značajnog Kruskal-Wallisovog testa, proveden je neparametarski test višestruke usporedbe prema Gao i dr. (2008.). Dinamika izlijevanja punoglavca pri različitim temperaturama i tretmanima analizirana je pomoću Kaplan-Meierove analize preživljavanja (Kaplan i Meier, 1958.). Ova je metoda prikladna u istraživanjima koja uključuju mali broj životinja. Log-rank test (Mantel, 1966.) korišten je za određivanje statističke značajnosti razlika između krivulja izlijevanja pri različitim tretmanima, a p -vrijednost je prilagođena Bonferronijevom metodom za višestruke usporedbe. U svim statističkim testovima korištena je razina značajnosti $\alpha = 0.05$.

3. REZULTATI

U ovom istraživanju je potvrđena važnost temperature za embrionalni razvoj crvenog mukača (*Bombina bombina*). Općenito, vrijeme izlijevanja se smanjivalo s povećanjem temperature okoliša (slika 1). Temperatura od 8 °C bila je preniska za razvoj jaja *B. bombina*, te se niti jedno jaje izloženo ovoj temperaturi nije izleglo, a u promatranom razdoblju od 16 dana došlo je do mortaliteta i raspadanja jajašaca. Najduže



Slika 1: Usporedba Kaplan-Meierovih krivulja za kontrolu, dimetoat i pirimifos-metil pri A) okolišnoj temperaturi od 12 °C, B) okolišnoj temperaturi od 18 °C, C) okolišnoj temperaturi od 25 °C, D) okolišnoj temperaturi od 30 °C.

vrijeme razvoja u kontrolnoj skupini zabilježeno je kod punoglavca izloženih 12 °C s medijalnim vremenom izlijevanja od 15 dana (slika 1). Na temperaturi od 18 °C, medijalno vrijeme izlijevanja punoglavca u kontrolnoj skupini bilo je samo šest dana, što je više od dva puta brže u odnosu na 12 °C. Na temperaturi od 25 °C, medijalno vrijeme izlijevanja u kontrolnoj skupini bilo je četiri dana, a na temperaturi od 30 °C tri dana.

Postotci izlegnutih punoglavca (medijan svih replikata) pri različitim eksperimentalnim temperaturama prikazani su u tablici 1. U kontrolnim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u uspješnosti izlijevanja između različitih temperatura ($p > 0,05$). Za skupine izložene pesticidima vrijeme izlijevanja nije ovisilo samo o temperaturi, već i o upotrijebljenom pesticidu. Nijedno jaje izloženo glifosatu nije se izleglo, bez obzira na temperaturu.

Na 12 °C jaja tretirana pirimifos-metilom počela su se izlijevati dva do četiri dana ranije nego u kontrolnoj skupini (slika 1A). To sugerira da spomenuti pesticid može ubrzati embrionalni razvoj jaja *B. bombina* budući da je medijalno vrijeme izlijevanja bilo statistički značajno kraće od kontrolne skupine i iznosilo je 12 dana (slika 1A; $p < 0,05$). Iako su se punoglavci izloženi dimetoatu počeli izlijevati ranije od punoglavca u kontrolnoj skupini, razlika u medijalnom vremenu izlijevanja nije statistički značajna ($p > 0,05$) te je medijalno vrijeme

vrijeme izlijevanja iznosilo 15 dana kao i u kontrolnoj skupini.

Na 18 °C i 25 °C, primjena pesticida nije uzrokovala stimulaciju embrionalnog razvoja jaja *B. bombina* (Slike 1B i 1C). Na 18 °C nije bilo statistički značajne razlike u medijalnom vremenu izlijevanja između tretiranih i kontrolne skupine. Na 25 °C, dimetoat je uzrokovao odgodu izlijevanja punoglavca za jedan dan ($p < 0,05$), dok pirimifos-metil nije utjecao na razvoj jaja *B. bombina* (medijalno vrijeme izlijevanja bilo je pet dana u odnosu na četiri dana u kontrolnoj i skupini izloženoj pirimifos-metil; $p > 0,05$). Na 30 °C oba pesticida uzrokovala su značajnu odgodu izlijevanja jaja *B. bombina*, pri čemu je medijalno vrijeme izlijevanja u kontrolnoj skupini iznosilo tri dana, a u skupinama izloženim pesticidima iznosilo je pet dana (slika 1D; $p < 0,05$).

4. RASPRAVA

U istraživanju utjecaja temperature i pesticida na jaja crvenog mukača, utvrđeno je da je optimalna temperatura okoliša za njihov razvoj između 20 °C i 25 °C što se popudara s postojećim podacima (Kinne i dr., 2006.) te da je pri temperaturama od 25 °C i 30 °C najkraće vrijeme potrebno za izlijevanje punoglavca, kako u kontrolnoj tako i u testnim skupinama. Pokazano je da isti pesticid može imati suprotno djelovanje na razvoj jaja crvenog mukača, ovisno o temperaturi. S jedne strane, izlaganje

Tablica 1: Uspješnost izlijevanja za svaki tretman i temperaturu. NP - nije postignuto. Statistički značajne razlike ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolnu skupinu označene su zvjezdicama.

Temperatura (°C)	Tretman	Medijan vremena izlijevanja (dani)	% izlegnutih punoglavaca
8	kontrola	NP	0
	dimetoat	NP	0
	pirimifos-metil	NP	0
	glifosat	NP	0
12	kontrola	15	83,3
	dimetoat	15	83,3
	pirimifos-metil	12*	93,3
	glifosat	NP	0
18	kontrola	6	93,3
	dimetoat	7	83,3
	pirimifos-metil	7	83,3
	glifosat	NP	0
25	kontrola	4	96,6
	dimetoat	5*	96,7
	pirimifos-metil	4	90,0
	glifosat	NP	0
30	kontrola	3	90,0
	dimetoat	5*	96,7
	pirimifos-metil	5*	96,6
	glifosat	NP	0

jaja pirimifos-metilu pri temperaturi od 12 °C je ubrzalo embrionalni razvoj i izlijevanje punoglavaca, dok je isti pesticid pri većim temperaturama imao inhibitorno djelovanje u odnosu na kontrolnu skupinu. Dosadašnja istraživanja utjecaja pirimifos-metila na vodozemce su vrlo štura. Djelovanje ovog pesticida istraženo je jedino na punoglavcima obične afričke krastače *Sclerophrys regularis* (Reuss, 1833.) u svrhu određivanja LC_{50} vrijednosti (2,79 mg/L za 72 sata; Onadeko i Amaeze, 2015.). Pirimifos-metil hidrolizira relativno brzo pri kiselom pH, s poluživotom od 7,3 dana pri pH 5, 79 dana pri pH 7 i 54 - 62 dana pri pH 9 (USEPA, 2006.). U eksperimentu, pH medija iznosio je 7, što podrazumijeva da nije došlo do značajnije razgradnje pesticida tijekom trajanja istraživanja. Upravo zbog toga, kako bi se u obzir uzelo i vrijeme razgradnje istraživanih pesticida, medij tijekom cijelog pokusa nije mijenjan.

Izlaganje jaja vrste *B. bombina* dimetoatu je pokazalo negativan utjecaj ovog pesticida na brzinu izlijevanja punoglavaca pri temperaturama 25 °C i 30 °C. Jedino istraživanje međudjelovanja dimetoata i temperature provedeno je na dudovom svilcu, *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758.) i pokazalo je povećani mortalitet s povećanjem temperature s 20 °C na 25 °C i 30 °C (Shanmugasundaram i dr., 2015.). Iako kod nas nije došlo do povećanja mortaliteta pri navedenim temperaturama, usporeni embrionalni razvoj je posljedica djelovanja dimetoata što ukazuje na moguće negativne posljedice ovog pesticida na neciljne organizme. Naime, punoglavci crvenog mukača često se razvijaju u privremenim vodenim tijelima te usporeni embrionalni razvoj može ugroziti njihov opstanak budući da pri višim temperaturama može doći do ubrzanog isušivanja staništa.

Glifosat je pokazao vrlo jako djelovanje na jaja crvenog mukača, te se niti jedno jaje nije izleglo bez obzira na temperaturu. Ovo je u skladu s već dostupnim saznanjima o djelovanju ovog pesticida na vodozemce. Jayawardena i dr. (2011.) uspoređivali su akutni i kronični učinak nekoliko različitih pesticida na vrstu *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799.) te su pokazali da je glifosat unatoč najvišoj LC_{50} vrijednosti (45,94 mg AT/L, za 48-satno razdoblje), također imao i najmanju stopu preživljavanja pri kroničnom izlaganju koncentracijama od 0,25 do 1 mg AT/L što bi moglo objasniti i naše rezultate. Relyea (2005.) je istraživao djelovanje glifosata u uvjetima sličnijim onima u prirodi, tako što je postavio zajednicu punoglavaca u mezokozmosu na otvorenom te je pokazao visoki mortalitet (do 100 %) pri koncentraciji od 3,8 mg AT/L. Ovi rezultati ukazuju da su koncentracije glifosata koje mogu negativno djelovati na vodozemce vrlo različite te da je za vrstu *B. bombina* koncentracija korištena u ovom istraživanju bila previsoka za njihov razvoj. Istraživanje glifosata na punoglavce smeđe krastače *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758.) je pokazalo izraženiji negativan utjecaj na rast, deformacije repa i mortalitet pri temperaturi od 15 °C nego pri 20 °C (Baier i dr., 2016.).

Podaci iz Manausa u Brazilu su pokazali da su herbicidi (uključujući glifosat) odgovorni za nestanak dvije vrste žaba na lokalnoj razini koje su prije prenamjene staništa u poljoprivredne svrhe i upotrebe herbicida bile vrlo česte na tom području (Ferrante i Fearside, 2020.). Osim toga, kod vrsta koje su još uvijek prisutne na staništu, zabilježene su brojne malformacije što je u skladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja poput onog od Sayima (2010.) koji je istraživao akutno djelovanje herbicida trifluralina na mortalitet, malformacije i stopu rasta kod embrija crvenog mukača te je pokazao da se djelovanje povećava s porastom koncentracije. Upravo ovakvi rezultati su od iznimnog značaja za očuvanje ove vrste te također podupiru i rezultate našeg istraživanja. Koleska i Jablonski (2016.) su zabilježili dvije jedinke žutog mukača *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758.) s malformacijama stražnjih udova te sugeriraju bi to mogla biti posljedica djelovanja agrokemikalija. Ipak, ovi rezultati se razlikuju od istraživanja koja su proveli Briggs i Damm (2004.) koji su istraživali utjecaj pesticida na crvene mukače u prirodnom ekosustavu i primijetili su da pesticidi nisu značajno utjecali na izlijevanje punoglavaca. S druge strane Greulich i dr. (2002.) su utvrdili da želatinozna kapsula koja obavija embrije mukača nije dovoljna zaštita od negativnog djelovanja pesticida što se u našem istraživanju najbolje vidjelo na primjeru glifosata kod kojeg se niti jedan punoglavac nije izlegao. Ova zapažanja podupiru i rezultati Greulich i Pflugmachera (2004.) koji su pokazali da pesticidi mogu proći kroz želatinoznu ovojnicu embrija te utjecati na njihov razvoj. Baier i dr. (2016.) su također pokazali da su jaja smeđe krastače (*B. bufo*) osjetljivija na djelovanje glifosata od samih punoglavaca što dodatno potvrđuje ovu hipotezu.

Nadalje, istraživanja su pokazala da vrste koje se razmnožavaju kasnije tijekom sezone (kao što je to slučaj i kod mukača) imaju veću vjerojatnost da budu izložene djelovanju pesticida od vrsta koje se razmnožavaju ranije u sezoni (npr. močvarna smeđa žaba *Rana arvalis* (Nilsson, 1842.)) zbog preklapanja vremena razmnožavanja i primjene pesticida (Lenhardt i dr., 2015.). Istraživanja u Njemačkoj u razdoblju od 1992. do 2012. godine su ispitala vjerojatnost koincidencije aplikacije glifosata i populacija crvenog mukača u prirodi te su ustanovili da je s vremenom došlo do značajnog povećanja te vjerojatnosti (Berger i dr., 2018.). Ova saznanja sugeriraju da je potrebno periodički revidirati okolišne rizike, obzirom da se brojne regulative oslanjaju na te podatke. Iz tog razloga, istraživanje djelovanja pesticida na crvenog mukača, poput našeg, je od iznimne važnosti.

Bridges i Semlitsch (2000.) su potvrdili da se podaci o dinamici ugibanja razlikuju za različite vrste, ali i između te unutar populacija iste vrste (značajna razlika može postojati između nakupina jaja, dok su rezultati unutar pojedine nakupine uvijek koherentni). Slične rezultate su zabilježili Bishop i dr. (2010.) koji su potvrdili da uspješnost izlijevanja u kontaminiranoj vodi

uvelike ovisi o vrsti, ali i o sastavu zagađivala kao i o kemijskim osobinama vode. Sve to dodatno povećava značaj istraživanja na svakoj novoj vrsti, posebno za one koje su uvrštene na Crveni popis kao što je to slučaj i sa crvenim mukačem. Wagner i dr. (2014.) su zaključili da bi se praćenje stanja i zaštita pojedinih vrsta trebale provoditi lokalno kako bi se izbjeglo smanjenje brojnosti na nacionalnoj, odnosno regionalnoj razini.

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje koje razmatra i druge čimbenike, osim direktnog utjecaja pesticida, kao što je npr. temperatura, dodatno dobija na važnosti jer nam omogućava bolje razumijevanje neplaniranih posljedica koje nastaju njihovim međudjelovanjem te je stoga istraživanje ovih tema izuzetno važno.

Pesticidi mogu pokazati različite učinke na neciljne organizme u ovisnosti o temperaturi okoliša. Naime, pesticid pirimifos-metil, pri suboptimalnoj temperaturi za razvoj jaja crvenog mukača (12 °C) uzrokovao je skraćivanje embrionalnog razvoja dok je isti pesticid pri višim temperaturama (30 °C) produljio embrionalni razvoj. Dimetoat je također produljio trajanje embrionalnog razvoja pri višim temperaturama (25 °C i 30 °C). Ovo ukazuje na potencijalne negativne sinergističke učinke koji se mogu javiti uslijed klimatskih promjena budući da s jedne strane dolazi do produljenja embrionalnog razvoja dok istovremeno dolazi do ubrzanog isušivanja staništa.

ZAHVALA

Ovo istraživanje je provedeno na temelju dopuštenja Ministarstva zaštite okoliša i prirode Republike Hrvatske.

LITERATURA

- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Nicely, P.A., Vlaming, Vd., Connor, V., Richard, N., Tjeerdema, R.S. (2003.): Integrated assessment of the impacts of agricultural drain water in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution*, 124, 523–532. doi.org/10.1016/s0269-7491(03)00012-5
- Agasyan, A., Avisi, A., Tuniyev, B., Crnobrnja Isailovic, j., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzümlü, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., Kaya, U. (2009.): *Bombina bombina*. The IUCN Red List of Threatened Species e.T2865A9489517. doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T2865A9489517.en. Downloaded on 25 November 2021.
- Beebee, T.J.C. (1995): Amphibian breeding and climate. *Nature*, 374, 219–220. doi.org/10.1038/374219a0
- Berrill, M., Bertram, S., Coulson, D., Kolohon, M., Ostrander, D., Pauli, B. (1995.): Comparative sensitivity of amphibian tadpoles to single and pulsed exposures of the forest-use insecticide fenitrothion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(6), 1011–1018. doi.org/10.1002/etc.5620140612
- Berntssen, M.H.G., Rosenlund, G., Garlito, B., Amlund, H., Sissener, N.H., Bernhard, A., Sanden, M. (2021.): Sensitivity of Atlantic salmon to the pesticide pirimiphos-methyl, present in plant-based feeds. *Aquaculture*, 531, 735825. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735825
- Bishop, C.A., Ashpole, S.L., Edwards, A.M., Aggelen, G., Elliott, J.E. (2010.): Hatching success and pesticide exposures in amphibians living in agricultural habitats of the South Okanagan Valley, British Columbia, Canada (2004–2006). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(7), 1593–1603. doi.org/10.1002/etc.202
- Blaustein, A.R., Belden, L.K., Olson, D.H., Green, D.M., Root, T.L., Kiesecker, J.M. (2001.): Amphibian Breeding and Climate Change. *Conservation Biology*, 15(6), 1804–1809.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B., Sousa, W.P. (1994.): Amphibian declines: Judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinction. *Conservation Biology*, 8(1), 60–71.
- Bridges, C., Semlitsch, R. (2000.): Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology*, 14(5), 1490–1499. doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99343.x
- Briggs, L., Damm, N. (2004.): Effects of pesticides on *Bombina bombina* in natural pond ecosystems. Ministry of Environment, Danish Environmental Protection Agency, Pesticides Research no. 85.
- Broomhall, S.D. (2004.): Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 105–113. doi.org/10.1111/j.1365-2664.2004.00883.x
- Collins, J.P., Crump, M.L. (2009.): *Extinction in our times. Global amphibian decline*. Oxford University Press, Oxford.
- Collins, J. (2010.): Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2–3), 93–99. doi.org/10.3354/dao02307.
- Gao, X., Alvo, M., Chen, J., Li, G. (2008.): Nonparametric multiple comparison procedures for unbalanced one-way factorial designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 138(8), 2574–2591. doi.org/10.1016/j.jspi.2007.10.015
- Ghini, S., Fernández, M., Picó, Y., Marín, R., Fini, F., Mañes, J., Girotti, S. (2004): Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental*

- Contamination and Toxicology*, 47(4), 479–488. doi.org/10.1007/s00244-003-3219-y.
- Gosner, K. (1960.): A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.
- Greulich, K., Hoque, E., Pflugmacher, S. (2002.): Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52(3), 256–266. doi.org/10.1006/eesa.2002.2182
- Greulich, K., Pflugmacher, S. (2004.): Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin in embryos and tadpoles of amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(4), 489–495. doi.org/10.1007/s00244-004-2302-3
- Hartel, T. (2008.): Weather conditions, breeding date and population fluctuation in *Rana dalmatina* from central Romania. *Herpetological Journal*, 18(1), 40–44.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. (2002.): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5476–5480. doi.org/10.1073/pnas.082121499
- Hecnar, S.J., M'Closkey, R.T. (1996.): Regional dynamics and the status of amphibians. *Ecology*, 77(7), 2091–2097. doi.org/10.2307/2265703
- Hertwig, O. (1897.): Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung von *Rana fusca* und *R. esculenta*. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 51, 319–381. doi.org/10.1007/BF02977499
- Hollander, M., Wolfe, D.A. (1973.): *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons. 115–120.
- Jayawardena, U.A., Navaratne, A.N., Amerasinghe, P.H., Rajakaruna, R.S. (2011.): Acute and chronic toxicity of four commonly used agricultural pesticides on the Asian common toad, *Bufo melanostictus* Schneider. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 39(3), 267–276. doi.org/10.4038/jnsfsr.v39i3.3631
- Jelić, D., Kuljerić, M., Koren, T., Treer, D., Šalamon, D., Lončar, M., Podnar Lešić, M., Janev Hutinec, B., Bogdanović, T., Mekinić, S., Jelić, K. (2015.): Crvena knjiga vodozemaca i gmazova Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, Hrvatsko herpetološko društvo – Hyla, Zagreb.
- Jovanović, O., Jelić, D. (2015): Conservation and declines of amphibians in Croatia. *Amphibian Biology*, Volume 11: Status of Conservation and Decline of Amphibians: Eastern Hemisphere, Part 4: Southern Europe and Turkey (ur. Heatwole, H. i Willkinson, J.W.), 25–31. Exeter: Pelagic Publishing.
- Kaplan, E., Meier, P. (1958.): Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457–481. doi.org/10.2307/2281868
- Katzenberger, M., Hammond, J., Duarte, H., Tejado, M., Calabuig, C., Relyea, R.A. (2014.): Swimming with predators and pesticides: How environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PLoS ONE*, 9(5), e98265. doi.org/10.1371/journal.pone.0098265
- Kiesecker, J., Blaustein, A., Belden, L. (2001.): Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410, 681–684. doi.org/10.1038/35070552
- King, H.D. (1903.): The effect of heat on the development of toad's egg. *Biological Bulletin*, 5(4), 218–232. doi.org/10.2307/1535737
- Kinne, O., Kunert, J., Zimmermann, W. (2006.): Breeding, rearing and raising the red-bellied toad *Bombina orientalis* in the laboratory. *Endangered Species Research*, 1, 11–23. doi.org/10.3354/esr001011
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R. (2008.): Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 147(2), 222–231. doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009
- Lawal, M.O., Samuel, O.B. (2010.): Investigation of acute toxicity of pirimiphos-methyl (Actellic, 25%EC) on guppy (*Poecilia reticulata*, Peters, 1859). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(8), 405–408. doi.org/10.3923/pjbs.2010.405.408
- Mann, R.M., Bidwell, J.R. (1999.): The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2), 193–199. doi.org/10.1007/s002449900460
- Mantel, N. (1966.): Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer chemotherapy reports* 50, 163–170.
- Mizgirev, I.V., Flax, N.L., Borkin, L.J., Khudoley, V.V. (1984.): Dysplastic lesions and abnormalities in amphibians associated with environmental conditions. *Neoplasma*, 31(2), 175–181.
- NCP (2013.): Canadian Arctic Contaminants Assessment Report III, Persistent Organic Pollutants in Canada's North. Muir, D., Kurt-Karakus, P., Stow, J. (Ur), Ottawa: Aboriginal Affairs and Northern Development Canada.
- Onadeko, A.B., Amaeze, N.H., Favour, N.E. (2015.): Acute toxicity of agrochemicals and detergent on tadpoles of the common African toad, *Amietophrynus regularis*. *UNILAG Journal of Medicine, Science and Technology*, 3(1), 103–111.
- Pounds, J.A. (2001.): Climate and amphibian declines. *Nature*, 410, 639–640. doi.org/10.1038/35070683
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., et al., (2006.): Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439, 161–167. doi.org/10.1038/nature04246
- R Development Core Team. R (2015.): *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/>
- Relyea, R.A. (2004.): Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of

- pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1737–1742. doi.org/10.1897/03-493
- Relyea, R.A. (2005.): The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4), 1118–1124. doi.org/10.1890/04-1291
- Relyea, R.A. (2009.): A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2), 363–376. doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9
- Relyea, R.A., Diecks, N. (2008.): An unforeseen chain of events: Lethal effects of pesticides at sublethal concentrations. *Ecological Applications*, 18(7), 1728–1742. doi.org/10.1890/08-0454.1
- Relyea, R.A., Hoverman, J.T. (2006.): Assessing the ecology in ecotoxicology: A review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*, 9(10), 1157–1171. doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00966.x
- Relyea, R.A., Jones, D.K. (2009.): The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004–2008. doi.org/10.1897/09-021.1
- Rovedatti, M.G., Castañé, P.M., Topalián, M.L., Salibián, A. (2001.): Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista River. *Water Research*, 35(14), 3457–3461. doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00058-6
- Sayim, F. (2010.): Toxicity of trifluralin on the embryos and larvae of the red-bellied toad, *Bombina orientalis*. *Turkish Journal Zoology*, 34(4), 479–486. doi.org/10.3906/zoo-0811-21
- Sayim, F., Kaya, U. (2005.): Effects of dimethoate on tree frog (*Hyla arborea*) larvae. *Turkish Journal Zoology*, 30(3), 261–266.
- Shanmugasundaram, R., Jeyalakshmi, T., Mohan S.S., Hilda, S., Saravanan, M., Geetha, S., Kannadasan, J., Goparaju, A. (2015.): Effect of temperature on toxicity of dimethoate 30% EC to mulberry silkworm, *Bombyx mori* (Linn.). *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 5(1), 55–60.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. (1965.): An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4), 591–611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591
- Silveira, R.D., Faroni, L.R.A., Guedes, R.N.C., Queiroz, M.E.L.R., Pimentel, M.A.G. (2009.): Biological activity and persistence of pirimiphos-methyl applied to maize grain at different temperatures. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 13(6), 729–733. doi.org/10.1590/S1415-43662009000600010
- Sparling, D.W. (2003.): A review of the role of contaminants in amphibian declines. *Handbook of ecotoxicology*, (ur. Hoffman, D., Rattner, B.A., Cairns, J.). Boca Raton: Lewis Publishers.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. (2004.): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783–1786. doi.org/10.1126/science.1103538
- USEPA (2004.): *Overview of the Ecological Risk Assessment Process in the Office of Pesticide Programs*. Washington DC: USEPA.
- USEPA (2006.): *Interim registration Eligibility Decision for Pirimiphos-methyl Case No. (2535)*. Washington DC: USEPA.
- Wagner, N., Rödder, D., Brühl, C.A., Veith, M., Lenhardt, P.P., Lötters, S. (2014.): Evaluating the risk of pesticide exposure for amphibian species listed in Annex II of the European Union Habitats Directive. *Biological Conservation*, 176, 64–70. doi.org/10.1016/j.biocon.2014.05.014
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T. (2008.): Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 11466–11473. doi.org/10.1073/pnas.0801921105
- Welsh, H.H.Jr., Ollivier, L.M. (1998.): Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: A case study from California's redwoods. *Ecological Applications*, 8(4), 1118–1132. doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008 1118:SAIOE 2.0.CO;2
- Westlake, G.E., Bunyan, P.J., Martin, A.D., Stanley, P.I., Steed, L.C. (1981.): Organophosphate poisoning. Effects of selected organophosphate pesticides on plasma enzymes and brain esterases of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(4), 772–778. doi.org/10.1021/jf00106a021
- Wren, S., Angulo, A., Meredith, H., Kielgast, J., Dos Santos, M., Bishop, P. (2015.): Amphibian Conservation Action Plan. IUCN SSC Amphibian Specialist Group. <https://www.iucn-amphibians.org/resources/acap/>

IMPACT OF TEMPERATURE AND PESTICIDES ON HATCHING OF THE EUROPEAN FIRE-BELLIED TOAD, *BOMBINA BOMBINA* (LINNAEUS, 1761)

Abstract. Amphibians are recognized as the globally most endangered group of vertebrates, one of the reasons being the application of various xenobiotics, such as pesticides. The paper examines the impact of different pesticides on the *Bombina bombina* egg development. Dimethoate, pirimiphos-methyl and glyphosate at different temperatures were used. The hatching of exposed eggs was observed at temperatures of 8°C, 12°C, 18°C, 25°C and 30°C, and compared to the control group. Regardless of the treatment, the temperature of 8°C was too low for the embryonic development of the European fire-bellied toad. At the temperature of 12°C, the eggs treated with pirimiphos-methyl hatched before those in the control group and group exposed to dimethoate. Pirimiphos-methyl and dimethoate had the strongest impact on the embryonic development at the temperature of 30°C, causing its prolongation. In addition, this research confirmed the negative impact of glyphosate on embryonic development of toads, earlier recorded in other amphibian species, with no eggs from this group hatching.

Key words: amphibians, dimethoate, pirimiphos-methyl, glyphosate, embryonic development

DER EINFLUSS VON TEMPERATUR UND PESTIZIDEN BEIM SCHLÜPFEN VON ROTBAUCHHUNKEN, *BOMBINA BOMBINA* (LINNAEUS, 1761.)

Zusammenfassung. Amphibien sind die weltweit am meisten gefährdete Gruppe von Wirbeltieren und einer der Gründe dafür ist die Anwendung verschiedener Xenobiotika wie zum Beispiel Pestizide. In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Pestizide auf die Entwicklung von Larven der Rotbauchunken, *Bombina Bombina*, untersucht. Dimethoat, Pirimiphos-Methyl und Glyphosat wurden bei unterschiedlichen Temperaturen benutzt. Beobachtet wurde die Dynamik der ausgesetzten Schlüpfung bei Temperaturen von 8°C, 12°C, 18°C, 25°C und 30°C und mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Temperatur von 8°C war zu niedrig für eine embryonale Entwicklung der Rotbauchunken, unabhängig von der Behandlung. Bei der Temperatur von 12°C schlüpften Eier, die mit Pirimiphos-Methyl behandelt wurden, vor der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Dimethoat ausgesetzt war. Pirimiphos-Methyl und Dimethoat zeigten die stärkste Wirkung auf die Embryoentwicklung bei der Temperatur von 30°C, wo es zu einer Verlängerung kam. Diese Untersuchung bestätigte außerdem eine negative Wirkung von Glyphosat auf die Embryoentwicklung der Frösche, die früher bei anderen Amphibien festgestellt wurde, kein Ei aus dieser Gruppe schlüpfte.

Schlüsselwörter: Amphibien, Dimethoat, Pirimiphos-Methyl, Glyphosat, Embryoentwicklung