

VPLIV IVERMEKTINA NA VID OPRAŠEVALCEV

Biologija

Raziskovalna naloga

Neža Kunič, Ema Železnik

3. letnik

Mentor: Gregor Križ mag. prof. biol.

Somentor: izr. prof. dr. Gregor Belušič

2023

Gimnazija Bežigrad

Zahvala

Zahvaljujeva se somentorju izr. prof. dr. Gregorju Belušiču za vso požrtvovalnost in potrpežljivost, koristne nasvete ter priložnost, da sva lahko poskuse izvajali pod njegovim vodstvom. Zahvaljujeva se mu za ves trud, za pripravljenost na raziskovanje tudi v večernih urah ter za vse navdušenje, ki ga je v nama vzbudil tekom dela. Zahvaljujeva se tudi celotni skupini za fiziologijo na Biotehniški fakulteti, da sva lahko izvajali poskuse v njihovih prostorih. Nadaljnje se zahvaljujeva šolskemu mentorju prof. Gregorju Križu za spodbudo in skrb glede napredka.

Povzetek

Opráševalci so živali, ki sodelujejo pri procesu oprášitve in imajo zato pomembno vlogo za ekosisteme. Ogrožajo jih številni posegi v okolje, med drugim prisotnost pesticidov in drugih škodljivih kemičnih sredstev. Od pandemije SARS-CoV-2 se je v naravi povečala prisotnost ivermektina, ki je praviloma antiparazitik, in je v času pandemije neutemeljeno dobil sloves kot zdravilo, četudi nedelujoče, proti novemu koronavirusu. V okviru raziskovalne naloge smo preučevali vpliv tega sredstva na vid opráševalcev, s tem, da smo opazovali odzivnost sestavljenih oči žuželk med njegovo aplikacijo. Zanimal nas je splošen vpliv sicer razširjenih pesticidov v okolju, vendar smo se odločili za uporabo ivermektina, čeprav le-ta ni najbolj razširjen. Drugi pesticidi so namreč lahko veliko bolj toksični in lahko vplivajo na zdravje, čemur se je bilo potrebno izogniti. Poskuse smo izvajali na šestih različnih živalih in prav toliko vrstah, specifično na štirih vrstah metuljev, eni čebeli in eni muhi trepetavki. Za raziskave smo uporabili metodo elektroretinografije (ERG). To je test, ki preverja odgovore vseh struktur v mrežnici ob draženju s svetlobnimi dražljaji. Organizme smo izpostavili zaporednim bliskom s stopnjevano frekvenco in opazovali odgovore fotoreceptorskih in živčnih celic pred in po nanosu ivermektina. Ugotovili smo, da je preprosta meritev električnega odziva oči na bliskanje, s površinskimi elektrodami, dovolj občutljiva za zaznavo vpliva pesticidov na žuželke. Opazili smo, da ivermektin negativno vpliva na vid opráševalcev, kajti velikost signala iz živčnih celic se po nanosu sredstva zmanjša, zato sklepamo, da bi se zaradi njega v naravi lahko spremenilo njihovo vedenje, kar bi negativno vplivalo na preživetje žuželk in na celotne ekosisteme.

Ključne besede: Opráševalci, ivermektin, elektroretinogram, vid žuželk, pesticidi

Abstract

Pollinators are animals that participate in the pollination process and therefore play an important role in ecosystems. They are under threat from numerous human impacts on the environment, including the presence of pesticides and other harmful chemical agents. Since the SARS-CoV-2 pandemic, the presence of ivermectin, which is generally an antiparasitic drug, has increased in nature as it gained an unjustified reputation as a drug allegedly (but ineffectively) curing the new coronavirus during the pandemic. In this study we examined the influence of this agent on the pollinator vision, by observing its effect on the responsiveness of insect compound eyes. We were interested in the impact of pesticides in the environment, but we decided to use ivermectin, even though it is not the most common one. In fact, other pesticides can be much more toxic and can affect human health, which was necessary for us to avoid during the experimental phase. Experiments were carried out on six different insects belonging to six species, specifically on four butterflies, one honeybee and a hoverfly. We used the method of electroretinography (ERG). This is a test that examines the responses of all structures in the retina in the presence of light stimuli. Organisms were exposed to successive flashes with an increasing frequency. We noticed that a simple measurement of the electrical response of the eyes to flash stimuli, with surface electrodes, is sensitive enough to detect the effect of pesticides. We observed how ivermectin negatively affects the vision of pollinators, because the signal from the observed cells decreased after the application, so we can conclude that ivermectin in nature could change their behavior, which would negatively affect the survival of insects and entire ecosystems.

Key words: Pollinators, ivermectin, electroretinogram, vision of insects, pesticides

Kazalo vsebine

Zahvala	2
Povzetek	3
Abstract	4
Kazalo vsebine	5
Kazalo slik	6
Tabela okrajšav	6
1. Uvod	7
2. Teoretično ozadje	8
2.1. Opraševalci	8
2.1.1. Splošno	8
2.1.2. Metulji	9
2.1.3. Čebele	11
2.1.4. Muhe trepetavke	13
2.1.5. Pomembnost oprasevalcev	15
2.2. Pesticidi	16
2.3. Ivermektin	17
2.3.1. Splošno	17
2.3.2. Mehanizem delovanja	18
2.3.3. Ekologija	18
2.3.4. Relevantnost pri oprasevalcih	19
2.4. Vid žuželk	20
2.4.1. Zgradba oči	20
2.4.2. Fototransdukcija	20
2.4.3. Vidna pot	21
2.4.4. Elektoretinogram (ERG)	22
3. Hipoteze	23
4. Metodologija	24
4.1. Materiali in pripomočki	24
4.2. Priprava oprasevalcev na poskuse	24
4.3. ERG	26
5. Rezultati	27
5.1. Simulacija rezultatov	27
5.2. Analiza rezultatov	29
5.3. Muha trepetavka	29
5.4. Čebela	33
5.5. Kapusov belin	34
5.6. Mali kopriavar	35

6. Diskusija	38
7. Zaključek	41
8. Viri in literatura	42

Kazalo slik

Slika 1: Odrasel metulj vrste kapusov belin (<i>Pieris brassicae</i>).	10
Slika 2: Odrasla medonosna čebela, delavka, sorte kranjska čebela (<i>Apis mellifera carnica</i>).	12
Slika 3: Odrasel samec vrste navadna zimna trepetavka (<i>Episyrphus balteatus</i>).	14
Slika 4: Molekula ivermektina.	18
Slika 5: a, Sestavljeno oko pri muhi brenčaki. b, Shematski prikaz sestavljenega očesa.	20
Slika 6: Shematski prikaz fototransdukcije.	21
Slika 7: Prikaz znotrajcelično in zunajcelično posnetih signalov iz fotoreceptorja.	22
Slika 8: Čebela, ujeta v prozorni posodici, ki smo jo kasneje vstavili v posodo z ledom.	25
Slika 9: Faradayeva kletka in orodja med potekom poskusa.	25
Slika 10: Simulacijski graf velikosti ERG v odvisnosti od frekvence draženja pred nanosom ivermektina.	27
Slika 11: Stimulacijski graf velikosti ERG v odvisnosti od frekvence draženja po nanosu ivermektina.	28
Slika 12: Vpliv aplikacije IM (pri času 11'40") na časovni potek odziva oči muhe (<i>Episyrphus balteatus</i> , <i>Diptera: Syrphidae</i>).	29
Slika 13: Vpliv aplikacije IM (pri času 11'40") na časovni potek ERG muhe (<i>Episyrphus balteatus</i>).	31
Slika 14: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja za muho trepetavko (<i>Episyrphus balteatus</i>).	32
Slika 15: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja pri čebeli (<i>Apis mellifera</i>).	33
Slika 16: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja za vrsto kapusov belin (<i>Pieris brassicae</i>).	34
Slika 17: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja za malega koprivarja (<i>Aglais urticae</i>) pred in po aplikaciji ivermektina.	35
Slika 18: Vpliv aplikacije IM na časovni potek odziva oči malega koprivarja (<i>Aglais urticae</i>).	36

Tabela okrajšav

Okrajšava	Pomen
IM	Ivermektin
ERG	Elektroretinogram
AVM	Avermektin(i)
LMC	Velika monopolarna celica (large monopolar cell)
NNDMFA	N,N-dimetilformamid (C_3H_7NO)

1. Uvod

Opráševalci so pomemben dejavnik pri uspešnem delovanju ekosistemov. S procesom opráševanja omogočijo razmnoževanje določenih rastlin. Te v ekosistemu omogočajo kroženje snovi, dajejo življenjski prostor ter hrano za živali in za ljudi. Poleg tega rastline tudi zadržujejo, čistijo vodo ter preprečujejo erozijo. Posledično opráševalci skrbijo za ohranjanje biodiverzitete (Genung, 2017). V okolju, v katerega posega človek, pa se opráševalci soočajo z mnogimi grožnjami – izgubo habitata, boleznimi, pomanjkanjem hrane in s številnimi pesticidi. Ti pesticidi se v okolju nabirajo zaradi povečane uporabe v kmetijske namene. Škodljive snovi pa v naravo vstopajo tudi preko človeške uporabe raznih zdravil, ki se kopičijo predvsem v vodnih sistemih (Katagi, 2006). Na tak način so jim tako izpostavljeni tudi opráševalci.

Namen te raziskovalne naloge je bil različne vrste žuželk, ki imajo v naravi vlogo opráševalcev, izpostaviti določenemu pestididu, ivermektinu (IM). Specifično smo opazovali vid teh žuželk in kako IM vpliva na čutne celice in živčne celice – velike monopolarne celice (LMC). Ta pristop smo izbrali kot robusten. IM (in drugi pesticidi) ima lahko poguben učinek pri nižjih koncentracijah, ki ne izzovejo sprememb v vidu, vendar pa vplivajo na vedenje. Če se v naravi poslabša vid opráševalcev, ti posledično svojo funkcijo opravljajo slabše, kar gotovo negativno vpliva na ekosistem. Učinek IM smo proučevali s pomočjo elektroretinograma (ERG) in opazovali signal, ki smo ga pridobili pred in po nanosu IM na testni organizem. IM sam ni najbolj razširjen in nevaren pestidid, ki je trenutno prisoten v okolju, a smo se za njegovo uporabo odločili zaradi lažje dostopnosti. Poleg tega smo morali poskrbeti za lastno varnost in varnost laboratorija, zato smo se odločili, da je zaradi manjše toksičnosti uporaba IM bolj primerna za naš poskus.

Pri raziskovanju smo se oprli na dve pretekli študiji (Liu in sod., 2021; Chen in sod., 2018). Pri obeh raziskavah so namreč avtorji uporabili metodo ERG, ki smo ga pri poskusih uporabljali tudi mi, poleg tega so v raziskavah proučevali vpliv organizmu nevarnih snovi, v njihovem primeru mikroplastike in DEHP (najbolj pogostega aditiva k plastiki). Mi smo opazovali vpliv antiparazitika ivermektina. Naše raziskave so bile izvirne tudi glede izbire testiranih organizmov, načina aplikacije in načina draženja živali s svetlobnimi signali.

2. Teoretično ozadje

2.1. Opraševalci

2.1.1. Splošno

Opraševalec je žival, ki pomaga prenašati cvetni prah iz moškega dela cveta (prašnika) na ženski del istega ali drugega cveta (pestiča, bolj natančno na brazdo pestiča). Premik cvetnega prahu se mora zgoditi, da poteče oploditev rastline in ta kasneje proizvede semena, plodove in mlade rastline. Nekatere rastline so samooprašne, druge pa se lahko oplodijo s cvetnim prahom, ki ga prenaša veter ali voda. Lahko pa pri prenosu pelodnih zrn pomagajo živali – kot so čebele, ose, molji, metulji, ptice, muhe in mali sesalci, vključno z netopirji. To so opraševalci. Žuželke in druge živali obiskujejo rože v iskanju hrane, zatočišča, materiala za gradnjo bivališč in včasih celo partnerjev. Nekateri opraševalci, vključno s številnimi vrstami čebel, namerno zbirajo cvetni prah. Drugi, kot so številni metulji, ptice in netopirji, cvetni prah premikajo po naključju. Ta se namreč prilepi na njihova telesa, medtem ko pijejo ali se hranijo z nektarjem med cvetenjem cvetov, in se nehote prenaša s cveta na cvet, kar povzroči opraševanje (Dobson, 2006). V tej raziskovalni nalogi bodo opraševalci, o katerih bomo govorili, izključno žuželke. Proučevali smo metulje, čebele in muhe trepetavke, ki jih v nadaljevanju predstavljamo podrobneje.

2.1.2. Metulji

Metulji (Slika 1) so žuželke iz reda *Lepidoptera*, kamor sodijo tako dnevni, kakor tudi nočni metulji ali večče. Odrasli metulji imajo velika, pogosto živo obarvana krila in opazen, plapolajoč let. So drugi največji red v razredu žuželk (Burnie, 2010). V svojem življenjskem ciklu gredo čez popolno preobrazbo, oziroma metamorfozo (Kopp, 2008).

Odrasla samica metulja odloži jajčeca na gostiteljske rastline ali v njihovo bližino. Te rastline bodo kasneje postale hrana za izlegle gosenice. Jajca lahko odlagajo spomladi, poleti ali jeseni. To je odvisno od vrste metulja. Metuljeva jajca so pogosto zelo majhna in jih samica ne izleže veliko na enkrat, da imajo potomci večjo možnost preživetja. Razlog za to je, da samica odloži jajčeca na rastline, ki bodo pozneje hrana za ličinke. Manjše število potomcev zagotavlja dovolj hrane (Rabasa, 2005). Naslednja faza v življenju metulja se imenuje ličinka (ker govorimo o metuljih, jo lahko imenujemo tudi gosenica). Naloga gosenice je pridobiti čim več založnih snovi. Ko gosenica raste, se tudi levi. Del hrane, zaužite v tem času, se shrani in jo organizem porabi kasneje v fazi odrasle živali. Gosenica je lahko gola ali dlakava in ima navadno devet parov nog, ter seveda nima razvitih kril (Friberg, 2011). Sledi faza bube. Odvisno od vrste lahko buba visi pod vejo, je skrita v listju ali zakopana pod zemljo. Buba mnogih moljev je zaščitena s svilenim zapredkom (Veldtman, 2007). Ta stopnja lahko traja nekaj tednov, mesec ali dlje. Nekatere vrste so v tej fazi celo dve leti. Ko se faza bube zaključi, iz kokona pride odrasel metulj. Odrasel osebek se pari in odlaga jajčeca. Nekatere vrste odraslih metuljev pridobivajo energijo s prehranjevanjem z nektarjem iz cvetov, mnoge vrste pa se nikoli ne prehranjujejo. Večina odraslih metuljev živi le en ali dva tedna, nekatere vrste pa pozimi prezimujejo in lahko živijo več mesecev (Burnie, 2010).

Telo odraslega metulja je sestavljeno iz glave, oprsja (ali trupa) in zadka. Na glavi ima sesalo, oziroma rilček, ki je navadno zvit kot vzmet in ga med hranjenjem raztegne, tako da doseže globlje v vrat cveta. Rilčki nekaterih metuljev so zakrneli, saj se kot odrasli osebki ne hranijo in zgolj porabljajo zaloge, ki so si jih nabrali v fazi ličinke. Na glavi sta poleg rilčka še očesi, ki sta sestavljeni iz tisočih leč v obliki šestkotnikov. Za voh uporabljajo tipalnice, ki pa služijo tudi kot pomoč pri letenju, saj pomagajo pri ravnotežju. Na trup se pritrjuje šest nog ter dva para kril, ki so večinoma živobarvna in sestavljena iz mnogih drobnih lusk. Barva kril je prilagojena za kamuflažo (ponavadi spodnja stran kril) in za znotrajvrstno prepoznavo (ponavadi zgornja stran kril) (Burnie, 2010).



Slika 1: Odrasel metulj vrste kapusov belin (*Pieris brassicae*). Vir: Wiki, 2023

Metulji so karizmatični in široko razširjeni ter se pojavljajo v različnih habitatnih tipih; zaradi tega so ekološko eden najbolj raziskanih taksonov. Lahko jih najdemo povsod, razen na Antarktiki. Taksonomsko gledano tvorijo dnevni metulji (naddružina *Papilionoidea*) naravno monofiletsko skupino, ki pripada redu *Lepidoptera*. Zgodnje delo na področjih sistematike in mimikrije je naredilo metulje za pomembne modelne sisteme in iz teh raziskav je nastalo področje "ekologije metuljev". V zadnjih nekaj desetletjih so metulji deležni vse večje pozornosti kot pomembne indikatorske vrste antropogenih sprememb rabe tal in podnebja (Diamond, 2014).

2.1.3. Čebele

Čebele (Slika 2) so krilate žuželke iz reda kožekrilcev, v sorodu z osami in mravljami, znane po svoji vlogi pri opraševanju in po proizvodnji medu. Čebele so monofiletska linija znotraj naddružine *Apoidea*. Uvrščamo jih v družino imenovano *Anthophila*. Obstaja več kot 20 000 znanih vrst čebel. Nekatere vrste, vključno z medonosnimi čebelami, čmrlji in čebelami brez žela, živijo družabno v kolonijah, medtem ko je večina vrst (več kot devetdeset odstotkov) samotark (Burnie, 2010). Tudi pri njih je značilna metamorfoza, oziroma popolna preobrazba (Kopp, 2008).

Čebele se izležejo iz jajčec, življenje pa nadaljujejo v fazi ličinke. Te se hranijo in zabubijo ter se sčasoma pojavijo v svoji odrasli obliki, v kateri obiščejo rastline, da se hranijo in nabirajo nektar in cvetni prah. Za razliko od udomačenih medonosnih čebel ali divjih čmrljev, ki tvorijo panje, je večina čebel samotark. Ne tvorijo panjev, ne proizvajajo medu in ne živijo skupnega življenja. Namesto tega odložijo jajčeca v vrsto majhnih komoric v tunelih v tleh, v votlih steblih rastlin ali v razpadajočem lesu. Za razliko od vrst čebel, ki oblikujejo panje in kolektivno skrbijo za svoje mlade, samice čebel samotark oskrbujejo svoja jajčeca z nektarjem in cvetnim prahom. Pustijo jih, da rastejo in se zabubijo same, brez pomoči staršev. Matice čmrljev lahko živijo eno leto, delavke pa en mesec (Barron, 2008). Čebele samotarke živijo tudi približno eno leto, pri čimer večino tega časa preživijo v svojem gnezdu, kjer se izležejo, zabubijo in pogosto prezimijo. Njihovo odraslo življenje, v katerem so aktivne, traja tri do osem tednov. Samice običajno živijo nekoliko dlje, saj morajo zgraditi gnezdo in odložiti jajca (Burnie, 2010).

Kot pri vseh žuželkah, je tudi čebelje telo razdeljeno na tri dele. In sicer na glavo z dvema antenama, oprsje s šestimi nogami in zadek. Vse čebele imajo dva para kril. Samo čebelje samice imajo žela (ki so spremenjene leglice – organi, ki so se prvotno uporabljali za odlaganje jajčec). Številne vrste čebel imajo črno in rumeno obarvanost, mnoge pa ne. Najdemo jih v različnih barvah, vključno z zeleno, modro, rdečo ali črno. Nekatere so črtaste, nekatere pa imajo celo kovinski lesk (Burnie, 2010).



Slika 2: Odrasla medonosna čebela, delavka, sorte kranjska čebela (Apis mellifera carnica). Vir: Genska banka

Med iskanjem hrane čebele opravijo kritično dejanje opráševanja. Ko čebela vstopi v cvet, da bi se hranila z nektarjem in nabrala cvetni prah, se nekaj cvetnega prahu prilepi na njeno telo. Ko čebela leti naprej, odloži nekaj tega cvetnega prahu na naslednji cvet, ki ga obišče. To povzroči oprášitev, ki vodi v oploditev, kar rastlini omogoči razmnoževanje in ustvarjanje sadežev in semen, na katere se številne druge divje živalske vrste zanašajo kot na vir hrane (Batra, 1995).

Tako udomačene medonosne čebele kot mnoge avtohtone vrste čebel so v zatonu. Možni vzroki za ta upad vključujejo bolezni, uničenje habitata, kmetijske in vrtné prakse, uporabo pesticidov, spremembe v rabi tal, invazivne vrste in podnebne spremembe. Opráševalci, zlasti čebele samotarke, so ključnega pomena za preživetje mnogih rastlin, drugih prostoživečih živali in ljudi (Requier, 2019).

2.1.4. Muhe trepetavke

Trepetavke (Slika 3) spadajo v red dvokrilcev, v družino *Syrphidae*. Pogosto jih vidimo lebdeči nad cvetovi; odrasli osebki mnogih vrst se prehranjujejo predvsem z nektarjem in cvetnim prahom, ličinke pa jedo široko paleto hrane. Pri nekaterih vrstah so ličinke saprotrofi, jedo razpadajoče rastlinske in živalske snovi v tleh ali v ribnikih in potokih. Pri drugih vrstah so ličinke žužkojede in plenijo listne uši, tripse in druge žuželke, ki sesajo rastline. Danes poznamo okoli 6000 različnih vrst. Gredo skozi proces popolne preobrazbe (Graham, 2011).

Po parjenju si samice prizadevajo odložiti jajčeca v habitat, ki je primeren za razvoj svojih ličink. V suhih razmerah je značilno, da se zrele ličinke selijo proč od gostiteljskih rastlin in iščejo vlažno ali rahlo zemljo, saj bube običajno potrebujejo vlažnost, da uspešno dozoriijo v odrasle osebke. Za trepetavke, ki plenijo listne uši ali mokaste stenice, je razvojni čas od jajčeca do odraslega osebka običajno 2 do 4 tedne. Take vrste imajo od 5 do 7 generacij potomcev na leto (Masehela, 2019).

Na splošno so predstavniki trepetavk majhni, z razponi kril med 18 in 20 milimetrov. Skupna značilnost vseh rodov so črne in rumene proge, ki pokrivajo telo. Večina vrst lebdečih muh skorajda nima dlak na telesu, zato so njihova telesa na videz sijoča. Oblika trebuha je lahko zaobljena ali vitka in podolgovata (prihaja do razlik med redovi). Oči so velike, zlasti pri samcih in nekoliko manjše pri samicah. Rilček ni zelo dolg, vendar se med iskanjem hrane lahko podaljša, da organizem doseže globlje dele cvetov. Njihove antene so majhne in se nahajajo na glavi. Noge so dolge in tanke (Masehela, 2019).



Slika 3: Odrasel samec vrste navadna zimska trepetavka (Episyrphus balteatus). Vir: Urbanatura, 2021

Trepetavke veljajo za ene izmed pomembnejših oprasovalcev. Obiskale naj bi vsaj 72 % svetovnih živilskih pridelkov. Poleg tega zagotavljajo ekosistemske funkcije, ki jih čebele ne, kot so na primer zaščita pridelkov pred škodljivci, recikliranje organskih snovi in prenos cvetnega prahu na daljše razdalje. Zlasti vrste, ki se selijo, so lahko izjemno številčne in za razliko od mnogih žuželk oprasovalcev se zdi, da še niso v resnem upadu (Doyle, 2020).

2.1.5. Pomembnost oprasevalcev

Skoraj 90 % divjih cvetočih rastlin potrebuje oprasevalce za prenos cvetnega prahu za uspešno spolno razmnoževanje. Te rastline pa so ključne za delovanje ekosistemov. Zagotavljajo hrano, tvorijo habitate in zagotavljajo široko paleto drugih virov za številne živalske vrste. Oprasevalci imajo zato ključno vlogo pri uravnavanju ekosistemskih storitev, ki podpirajo proizvodnjo hrane, nastanek habitatov in naravnih virov nasploh. Žuželke in drugi živalski oprasevalci pa so tudi ključnega pomena za pridelavo hrane, vlaken, užitnih olj, zdravil in drugih izdelkov. Ocenjeno je, da gojimo več kot 1300 vrst rastlin po vsem svetu za živilstvo, zdravila, dišave, začimbe in celo tkanine. Od teh, jih skoraj 75 % oprasijo živali. Toda zdaj populacija divjih in domačih oprasevalcev upada z alarmantno hitrostjo zaradi sprememb v njihovih hranilnih in gnezditvenih habitatih, krčenja naravnih ekosistemov, zastrupitve s pesticidi, tujerodnih vrst, bolezni in škodljivcev in nasploh človekove dejavnosti (Das, 2018). Zato je ohranjanje habitatov ključnega pomena pri ohranitvi populacij oprasevalcev.

2.2. Pesticidi

V okolju se živali lahko srečajo z različnimi vrstami pesticidov, ki imajo nanje različne učinke. Nekateri so lahko smrtni že akutno, vpliv drugih pa se opazi šele po kroničnem stiku z živaljo. Na to vpliva sama vrsta pesticida in njen odmerek (Belušič, 2023).

Pesticide, ki najbolj robustno vplivajo na organizme, imenujemo organofosfatni strupi. Uporabo organofosfatnih strupov, ki so jih začeli proizvajati okoli leta 1800, v sedanjosti večinoma opazimo v kmetijstvu, včasih pa so bili uporabljeni tudi v spopadih kot bojni plini (Robb, 2022).

Ko se molekula strupa absorbira, se veže na molekulo acetilholinesteraze, zaradi česar encim postane neaktiven (Robb, 2022). Ta encim ima vlogo nadziranja prenosa živčnih signalov po telesu. Pri vnosu strupa, se posledično s tem poveča količina nevrottransmitterja acetilholina. To zelo hitro vpliva na prenos signalov v sinapsah in na organizmu povzroči stranske učinke in simptome. Simptomi vključujejo povečano izločanje slin in solzenje, drisko, slabost, bruhanje, majhne zenice, potenje, tresenje mišic in zmedenost (Robb, 2022). Te se lahko pojavijo v minutah po zaužitju, njihove posledice pa so lahko opazne še več tednov po stiku strupa z organizmom.

Tako lahko sklepamo, da gre pri organofosfatnih strupih za zelo nevarne učinkovine, katerim smo se pri izvajanju poskusov želeli izogniti iz varstvenih in zdravstvenih razlogov. Poskusov z njimi zato nismo izvajali.

Poskuse smo zato izvajali z ivermektinom, ki spada v skupino strupov, ki so v primerjavi z organofosfatnimi strupi manj strupeni. Ivermektin je inhibitor glutamatnih kloridnih ionskih kanalov v nevretenčarskih mišičnih in živčnih celicah.

Pomembna spremenljivka pri uživanju strupa je tudi sama velikost doze. V okolju se namreč pojavlja veliko mikrodoz toksinov. Objavljene smernice določajo, da je mikroodmerek 1/100 pričakovanega farmakološkega odmerka, pod pogojem, da ne presega 100 µg ali 30 nmol (Robb, 2022). Ti odmerki nimajo direktnega učinka na organizem, oziroma nanj sprva delujejo neopazno. Posledice se kažejo šele na dolgi rok in nimajo nujno smrtnega učinka.

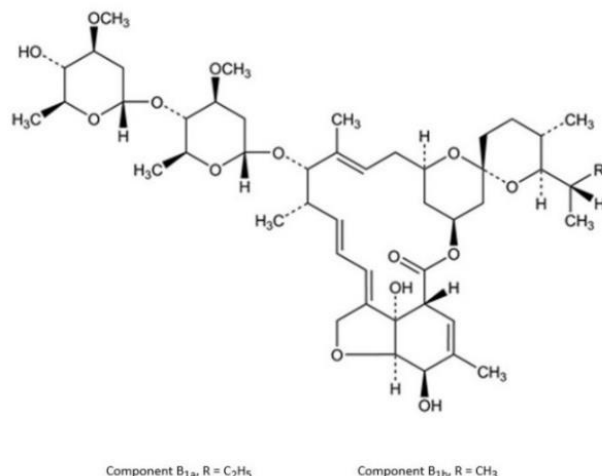
Sami smo pri poskusih uporabljali subletalne doze. To so odmerki, ki ne izzovejo smrti. Sicer strupenost snovi vrednotimo s parametrom LD₅₀. To je odmerek, ki je smrten za vsaj 50% testirane populacije. Pri subletalnih odmerkih torej ne pričakujemo smrti organizma, po zaužitju pa vseeno lahko opazimo spremembe, ki se kažejo na vedenju organizma. Pri izvajanju poskusov smo opazovali prav te spremembe.

2.3. Ivermektin

2.3.1. Splošno

Ivermektin (Slika 4) je antiparazitik, ki se uporablja za zdravljenje okužb s paraziti pri ljudeh in živalih in spada med vrsto zdravil in pesticidov avermektinov (Dourmishev, 2004). Pridobljen je iz bakterije *Streptomyces avermitilis* (Hazan, 2022). Pri ljudeh se uporablja proti ušivosti, garjam, rečni slepoti, askariozi in drugim. Po peroralni uporabi (uporabi z zaužitjem) se zaradi lipofilnosti v večji meri zadržuje v maščobnem tkivu. Možen je tudi topičen nanos sredstva. Stranski učinki prekomerne uporabe ivermektina pri ljudeh vključujejo slabost, bruhanje, drisko, hipotenzijo (znižanje krvnega tlaka), razne alergijske reakcije, vrtoglavico, ataksijo (moteno usklajenost mišičnih gibov), krče, komo in celo smrt. Odkrili so ga leta 1975, a se klinično ni začel uporabljati do leta 1981. Je bel do rumenksato bel prah, ki je slabo topen v vodi. Topen pa je v nekaterih nepolarnih topilih. Tableta ivermektina se imenuje Stromectol, ki vsebuje še druge neaktivne sestavine in je navadno na voljo v dozi 3 mg (National Library of Medicine, 2022).

Družina avermektinov (AVM) trenutno velja za eno glavnih zdravil, potrebnih za ohranjanje svetovnega zdravja, in je vključena na »Seznam osnovnih zdravil« Svetovne zdravstvene organizacije (WHO). Njegovo odkritje velja za izjemno, saj je AVM predstavljal prvi »endektocid« (kar pomeni, da deluje na endo in ektoparazite (zajedalce v telesu in na površini) na svetu, ki je bil sposoben uničiti najrazličnejše notranje in zunanje parazitske organizme v telesu. Leta 2015 sta znanstvenika, odgovorna za njegovo odkritje, William C. Campbell in Satoshi Ōmura, prejela Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino za razvoj terapij, ki so revolucionirale zdravljenje nekaterih najbolj agresivnih parazitskih bolezni (Souza, 2022).



Slika 4: Molekula ivermektina. Vir: National Library of Medicine, 2022

2.3.2. Mehanizem delovanja

Ivermektin se selektivno in z visoko afiniteto veže na glutamatne kloridne ionske kanale v nevrenčarskih mišičnih in živčnih celicah. Ta vezava povzroči povečanje prepustnosti celične membrane za kloridne ione in povzroči hiperpolarizacijo (spremembo membranskega potenciala proti negativni vrednosti) celice, kar povzroči paralizo in smrt parazita (Lynagh, 2012).

2.3.3. Ekologija

Trenutno se AVM pogosto uporabljajo v kmetijstvu kot veterinarsko zdravilo, zlasti za nadzor gastrointestinalnih valjastih črvov. Ker lahko okužbe s paraziti povzročijo zmanjšanje produktivnosti živine, obstaja močna finančna spodbuda, da takšna zdravila vključijo v svoje prakse in s tem zmanjšajo okužbe s paraziti. Zaradi tega so AVM najpogosteje uporabljeni antihelmintiki v ovčereji in konjereji v Veliki Britaniji ter v ZDA (McArthur, 2014). Obstaja tudi velik trg za AVM pri domačih hišnih ljubljenčkih.

Tako je glavna metoda, s katero AVM vstopajo v okolje, njihova prisotnost pri živini. Ocenjuje se, da lahko med 80 in 98 % zdravila, ko ga dajemo živalim, zapusti telo, ne da bi se presnovilo v blatu in tako nedotaknjeno doseže zemljo. Ko so AVM spuščeni v okolje je njihova nadaljnja usoda odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (nizka topnost v vodi, nehlapnost, visoka afiniteta za lipide in organske snovi). Akumulacija v vodi je malo

verjetna zaradi nizke topnosti, njihova obstojnost in kopičenje v tleh pa sta odvisna od dejavnikov, kot so podnebje, vrsta tal in pogostost uporabe pri živalih (de Souza, 2022).

2.3.4. Relevantnost pri oprasovalcih

V času pandemije SARS-coV-2 se je povečala uporaba ivermektina, saj so ga ljudje brez dokazov označili za zdravilo proti SARS-coV-2 oziroma COVIDU-19. Zaradi prekomerne in nekritične rabe so v tem času poročali o več zastrupitvah z ivermektinom, prav tako pa se je že povečala odpornost parazitov, na katere bi morale to sredstvo prvotno delovati. Zaradi številnih dejavnikov – na primer sorazmerno nizkega števila bolnikov za preizkušanje in hitrosti izvajanja teh preizkušenj – so bile študije o uporabi ivermektina pri COVID-19 polne metodičnih in statističnih napak. Kljub temu so ljudje prekomerno uživali ivermektin in s povečano uporabo te snovi, se je ta začela kopičiti v vodnih sistemih in čistilnih napravah, ter se je posledično znašla v ekosistemih, katere del so tudi oprasovalci (Hazan, 2022).

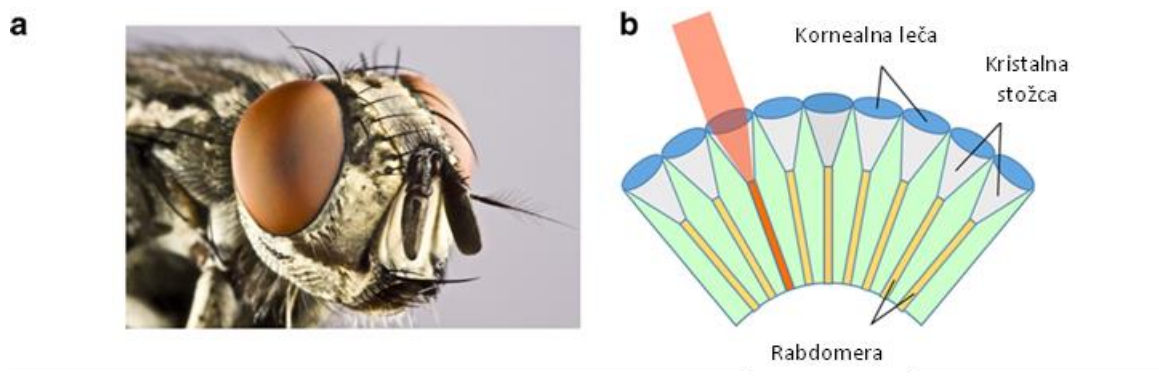
Drugi pesticidi v naravnem okolju so verjetno bolj obremenilni, vendar smo IM uporabili zaradi njegove relativne netoksičnosti za ljudi in možnosti nadzorovane aplikacije na žuželke v laboratoriju.

2.4. Vid žuželk

2.4.1. Zgradba oči

Zgradba oči pri žuželkah je popolnoma drugačna kot pri človeku. Imenujemo jih sestavljene oči in odrasle žuželke jih imajo po en par. Poleg tega imajo lahko tudi do tri ocele (preproste pikčaste oči), ki prepoznajo glavne vizualne informacije iz okolja in se nahajajo na zgornji strani glave v obliki trikotnika. Sestavljene oči so iz nekaj do 30 000 optičnih enot, omatidijev (Belušič, 2021). Zunanji del omatidijev imenujemo fasete ali kornealne leče, ki se na videz skoraj ne razlikujejo med seboj (so šesterokotnih, pravokotnih, kvadratnih oblik) in imajo premer 10-100 μm . Pod površino pa najdemo dva organizacijska tipa, dve optični načeli: apozicijsko in superpozicijsko optiko (Belušič, 2021). Prvo ima večina dnevnih žuželk, superpozicijsko pa lahko najdemo pri nočnih in nekaterih sekundarno dnevnih žuželkah (npr. vešče, hrošči govnači). Čeprav je samo oko sestavljeno iz ogromno omatidijev, vseeno delujejo kot celota, ki vzorči sliko okolja.

Posamezen omatidij je tako sestavljen iz kornealne leče, kristalnega stožca, pigmentnih celic in 8 ali 9 svetločutnih celic ali fotoreceptorjev, katerih svetločutni del imenujemo rabdomera (Slika 5). Ta je sestavljena iz mikrovilov, to so izrastki, ki vsebujejo beljakovine za zaznavo svetlobe.



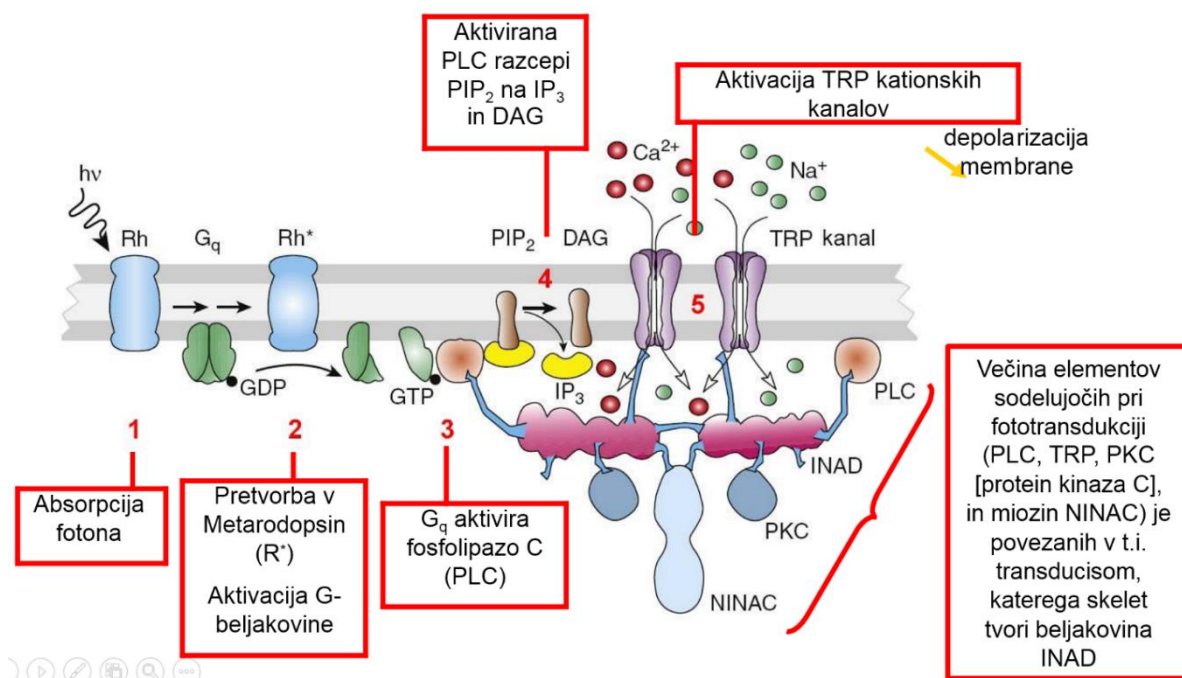
Slika 5: a, Sestavljeno oko pri muhi brenčarki. b, Shematski prikaz sestavljenega očesa. (povzeto).

2.4.2. Fototransdukcija

Svetločutne celice pretvarjajo vidne dražljaje iz okolice v vzburjenje v procesu čutilne transdukcije. Pretvorbo svetlobe v električno vzburjenje membrane svetločutnih celic imenujemo fototransdukcija (Belušič, 2021). Pri procesu je zelo pomembna molekula rodopsin, ki absorbira svetlobo, bolj natančneje foton svetlobe, in jo pretvori v električni

signal. Po absorpciji se rodopsin pretvori v metarodopsin. Ta aktivira signalno verigo (zgrajeno iz signalnih beljakovin in sekundarnih obveščevalcev), kar se odraža kot sprememba prevodnosti membrane za ione. To se kaže kot odprtje (depolarizacija) ali zaprtje (hiperpolarizacija) ionskih kanalov. Na celični membrani absorpcija fotona izzove elementarni dogodek, kvantni sunek. Ti se med sabo seštevajo in tvorijo makroskopsko spremembo napetosti na membrani, receptorski potencial (Slika 6).

Ves proces je izjemno hiter; od absorpcije fotona do spremembe potenciala na membrani čutilne celice minejo 3 ms ali manj. Posledično lahko insekti sledijo bliskom svetlobe, ki jih predvajamo >300-krat v sekundi (frekvenca draženja $f > 300$ Hz) (Belušič, 2023).



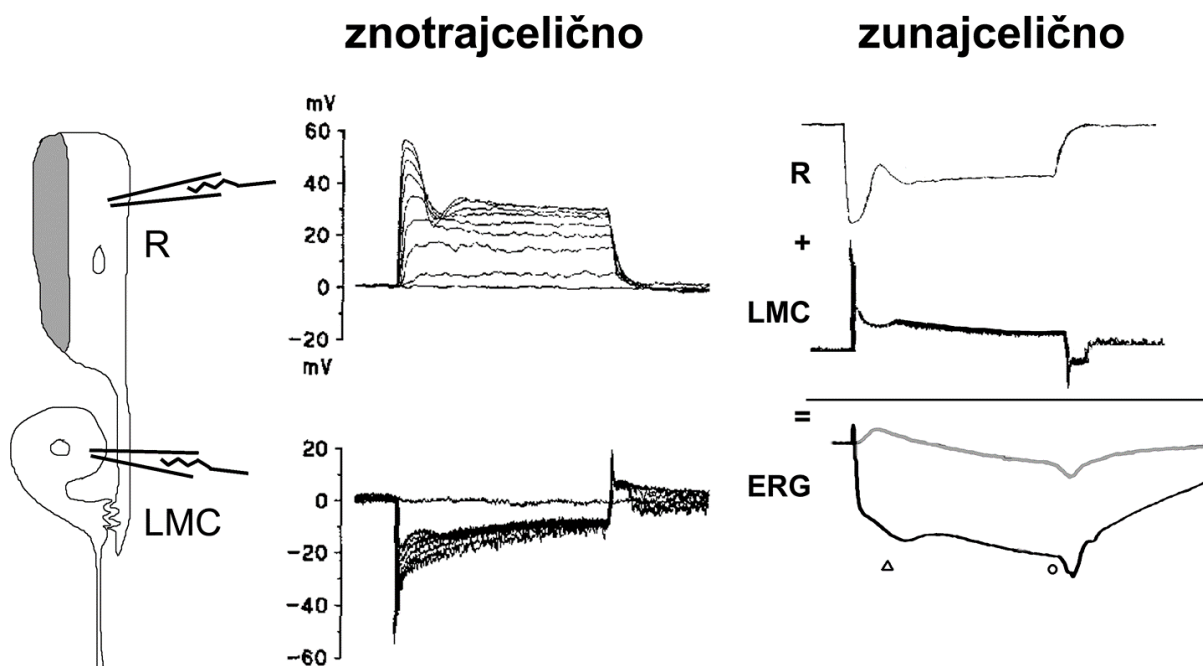
Slika 6: Shematski prikaz fototransdukcije. Vir: Belušič in Škorjanc, 2021

2.4.3. Vidna pot

Signali iz fotoreceptorjev se preko kemične sinapse prevajajo na višje internevrone v vidni poti. Živčni prenašalec na prvi sinapsi je histamin, ki odpira histaminergične kloridne ionske kanale na živčnih celicah LMC, ki signale iz fotoreceptorjev posredujejo naprej v možgane (Belušič, 2021). Domnevali smo, da bo ivermektin vplival na prenos signalov preko te kemične sinapse.

2.4.4. Elektroretinogram (ERG)

Elektroretinogram (ERG) je test, s katerim prikažemo zapis vseh svetlobnih dražljajev, ki se zgodijo na mrežnici. Pri žuželkah so opazovani dražljaji posledica delovanja fotoreceptorjev in LMC nevronov. Odziv fotoreceptorjev se kaže kot tonična depolarizacija, odziv nevronov LMC pa kot tonična hiperpolarizacija. Posamezni dražljaji so posneti z elektrodo, ki je postavljena ekstracelularno. Sam potek elektroretinograma se zgodi v štirih fazah, na začetku in koncu odgovora pa sta tranzientna vrhova, ON in OFF.



Slika 7: Prikaz znotrajcelično in zunajcelično posnetih signalov iz fotoreceptorja. Vir: Belušič in Škorjanc, 2021

Oblika ERG je vrstno specifična. Podatkov o obliki ERG pri proučevanih vrstah v literaturi nismo našli. Posamezne celične komponente (fotoreceptorji in LMC nevroni) prispevajo značilne faze; prispevek LMC je najbolj opazen pri višjih frekvencah draženja, pri nižjih pa prevlada signal iz fotoreceptorjev. Zato lahko pri draženju s stopnjujočo gostoto bliskov opazimo lokalni vrh vpliva LMC. Pri aplikaciji IM smo pričakovali upad prispevka LMC in s tem upad lokalnega vrha signala pri visokih frekvencah draženja (Belušič, 2023).

3. Hipoteze

Prva hipoteza, ki smo si jo postavili je, da bo proučevanje z elektroretinogramom, ali ERG-jem, dovolj robustna metoda za opazovanje učinka, ki ga bo ivermektin imel na dani organizem. Tako smo pričakovali, da bodo spremembe v električnih signalih čutnih celic živali opazne na njenem ERG in bo jasna razlika med signalom, ki je bil zabeležen, ko žival ni bila pod vplivom ivermektina in signalom po nanosu oz. začetku učinkovanja sredstva.

Predvideli smo tudi, da bo aplikacija ivermektina na kutikulo proučevane živali dovolj učinkovita, da se bodo pokazale spremembe v delovanju organizma. Ko bi nanešeno sredstvo prodiralo skozi kutikulo, bi prešlo v hemolimfo žuželke in bi se na tak način preneslo po njenem celotnem telesu, kar bi doseglo zadosten učinek in vplivalo na lastnosti senzornih signalov, ki smo jih opazovali. Natančneje smo predvidevali, da se bo ob aplikaciji ivermektina poslabšal prenos signala skozi glutamatne kloridne ionske kanale.

Pri raziskovanju smo proučevali metulje, čebele in muhe trepetavke. Pri tem smo predvideli, da bo ivermektin učinkoval na vse te organizme. Vse omenjene živali uvrščamo v razred žuželk (*Insecta*) poleg tega imajo, vsaj do neke mere, podobno oblikovano telo ter podoben življenjski cikel. Prav tako, so vsi našeti organizmi pomembni opravevalci, ki lahko pridejo v stik s pesticidi. Predvideli smo, da bodo posledice nanosa ivermektina vidne pri vseh proučevanih organizmih.

Uporabljali smo ivermektin v trdnem agregatnem stanju in smo zato posledično potrebovali nepolarno topilo, da bi s tem omogočili topičen nanos sredstva. Kot topilo smo uporabili N,N-dimetilformamid (NNDMFA, molekulska formula: C_3H_7NO). Pričakovali smo, da kljub temu, da gre za sintetično snov, ta ne bo imela vpliva na sam potek poskusa in, da bodo morebitne spremembe v delovanju organizmov izključno posledica ivermektina.

Ivermektin vpliva na membranske beljakovine, ki so ionski kanali, selektivno prepustni za kloridne ione, tako, da jih trajno odpre. Te beljakovine so prisotne v kemičnih sinapsah na živčnih celicah žuželk, med drugim tudi v sinapsi, kjer pride do prenosa signalov iz fotoreceptorjev na živčne celice LMC. Pričakovali smo, da bo aplikacija IM povzročila zmanjšanje ERG signala, zlasti v območju frekvenc, kjer je prispevek LMC pri posamezni vrsti najvišji.

4. Metodologija

4.1. *Materiali in pripomočki*

- Mreža za lovljenje metuljev
- Posoda z ledom
- Posodica s poroznim zamaškom
- Žiletka za britje
- Zmes čebeljega voska in kolofonije
- Nosilec za žuželko
- Elektrodi iz steklenih cev
- Fiziološka raztopina za metulje
- Klorirani srebrni žici
- Faradayeva kletka
- Avtomatska pipeta 0-100 µl (Eppendorf, Nemčija)
- Injekcija
- LED svetilka
- Ivermektin (Sigma Aldrich, Nemčija)
- Napolarno topilo (N,N-dimetilformamid)
- Funkcijski generator (Agilent, ZDA)
- Ojačevalnik signala DAM50 (WPI Instruments, ZDA)
- Laboratorijski vmesnik Powerlab 26T (ADInstruments, Avstralija)
- Računalnik z OS Windows 10
- Program za zajem signalov Labchart (ADInstruments, Avstralija)
- Programi iz nabora Microsoft Office: Word, Excel

4.2. *Priprava opráševalcev na poskuse*

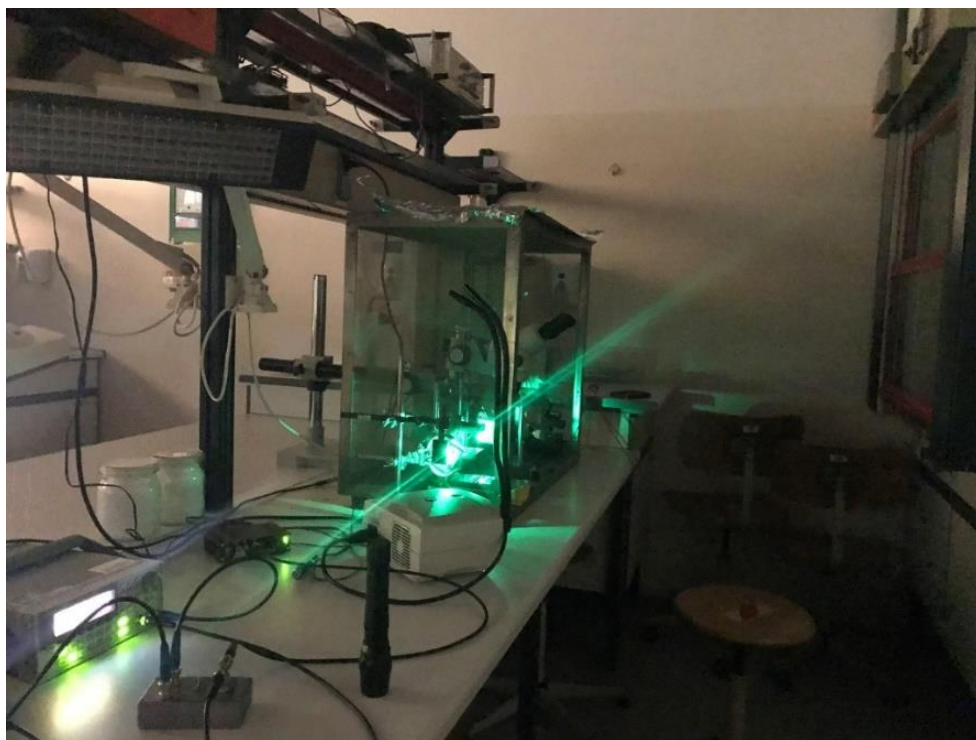
Opráševalce, pri katerih smo testirali učinke ivermektina, smo ujeli v okolici Biotehniške fakultete s pomočjo mreže za lovljenje metuljev. Posamezno žuželko smo nato v majhni plastični posodici s poroznim zamaškom (Slika 8) položili v posodo z ledom, da smo jo anestetizirali. Opráševalca smo pod mikroskopom obrili z žiletko za britje, mu odstranili krila ter ga z voskom, ki smo ga predhodno segreli, pritrdili na kovinsko ploščico.

Ploščico z žuželko smo nato vstavili v Faradayevo kletko (Slika 9) in nanjo namestili dve elektrodi iz steklenih cev. Cevki smo pred tem napolnili s fiziološko raztopino za metulje, ter vanjo vstavili klorirani srebrni žici, preko katerih smo merili odzive pri organizmu. Ena

elektroda je bila nastavljena v očesu opráševalca, druga, referenčna elektroda, pa v njegovem toraksu.



Slika 8: Čebela, ujeta v prozorni posodici, ki smo jo kasneje vstavili v posodo z ledom. Vir: Neža Kunič, 2022



Slika 9: Faradayeva kletka in orodja med potekom poskusa. Vir: Neža Kunič, 2022

4.3.ERG

Z meritvami ERG iz mrežnice smo določevali stopitveno frekvenco in kako se je ta spreminjala po nanosu ivermektina. Žuželko smo dražili z utripajočo zeleno lučko, katere svetilnost je sinusoidno nihala. Hitrost nihanja smo stopnjevali med 5 in 300 Hz; posamezen vlak dražljajev med mejnima frekvencama je trajal 10 s.

Najprej smo nekaj časa merili sam odziv žuželke na zeleno lučko, tako, da smo dobili ponavljajoč se vzorec. Po tem smo, pod mikroskopom, z avtomatsko pipeto na kutikulo nanесли odmerek ivermektina, raztopljenega v nepolarnem topilu v koncentraciji 0,1 %. Odmerki ivermektina so bili 1 ali 5 μL .

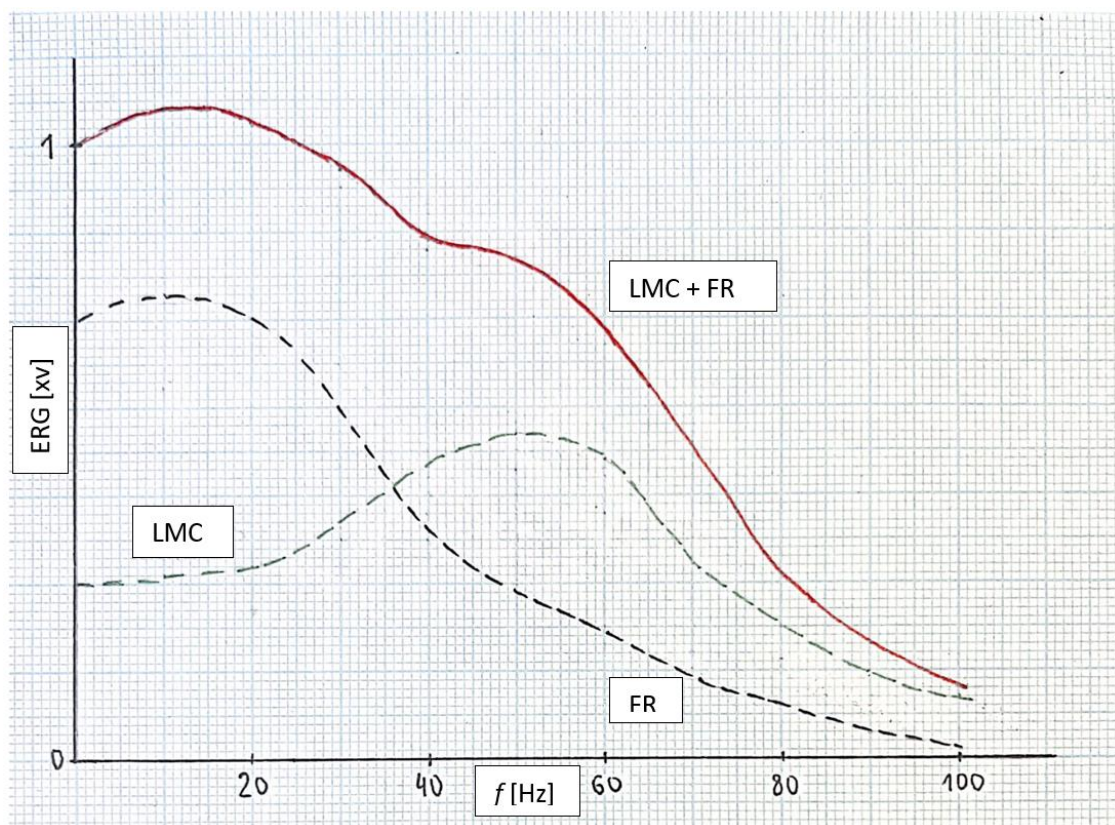
Sinusni pulzi so bili generirani z uporabo funkcijskega generatorja (Agilent, ZDA). Signal smo tudi ojačali s pomočjo diferencialnega ojačevalnika DAM50 (Wpi, ZDA), podatke pa smo na računalniku zbirali preko analogno/digitalnega pretvornika Powerlab 4/26T (ADInstruments, Avstralija). Za zajemanje smo uporabili program Labchart (ADInstruments, Avstralija).

V času izvajanja poskusa so bile živali na stalni temperaturi (sobni temperaturi) in pod stalno svetlobo (razen v času nanašanja s pipeto, saj smo si pomagali s svetilko, da smo lahko videli natančno mesto nanosa ivermektina, same poskuse smo sicer izvajali v temi).

5. Rezultati

5.1. Simulacija rezultatov

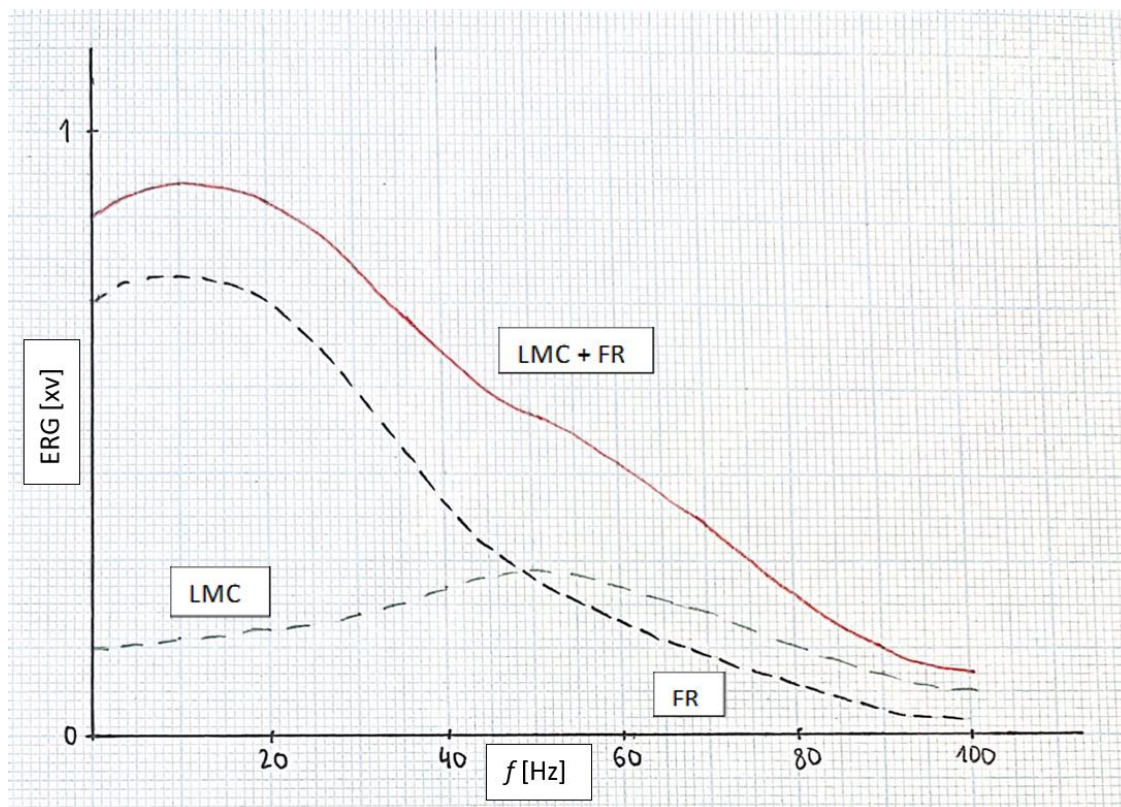
Pri razbiranju rezultatov s pomočjo grafov smo morali upoštevati, da so ti implicitno predstavljali seštevek dveh grafov, in sicer grafa odziva LMC nevronov ter grafa odziva fotoreceptorskih celic. Tako LMC nevroni kot fotoreceptorske celice imajo optimum delovanja pri različnih frekvencah, fotoreceptorske celice pri nižjih, LMC nevroni pa pri višjih. Zaradi tega smo pričakovali, da bo graf kompleksna krivulja. Pri ugotavljanju učinka ivermektina smo s pomočjo grafov frekvenčne odvisnosti pred in po nanosu opazovali, na katerem delu se je krivulja najbolj spremenila, in s tem določili, ali je ivermektin prizadel nevrone LMC ali fotoreceptorske celice.



Slika 10: Simulacijski graf velikosti ERG v odvisnosti od frekvence draženja pred nanosom ivermektina.
Vir: Neža Kunič, 2023

Na grafu (Slika 10), ki prikazuje simulacijo pred nanosom ivermektina, lahko razberemo, pri katerih frekvencah imajo optimum delovanja fotoreceptorske celice in pri katerih LMC nevroni. Črna krivulja na grafu prikazuje odziv fotoreceptorjev (na grafu označeno s FR), ki imajo optimum sprejemanja dražljajev med 5 in 20 Hz. Zelena črtkana krivulja (na grafu

označena z LMC) prikazuje odziv LMC nevronov, ki najbolj delujejo pri višjih frekvencah, med okoli 40 in 60 Hz. Rdeča krivulja (označena z LMC + FR) tako predstavlja seštevek obeh grafov. Na območju med 40 in 50 Hz lahko opazimo lokalni maksimum, ki je posledica delovanja nevronov.



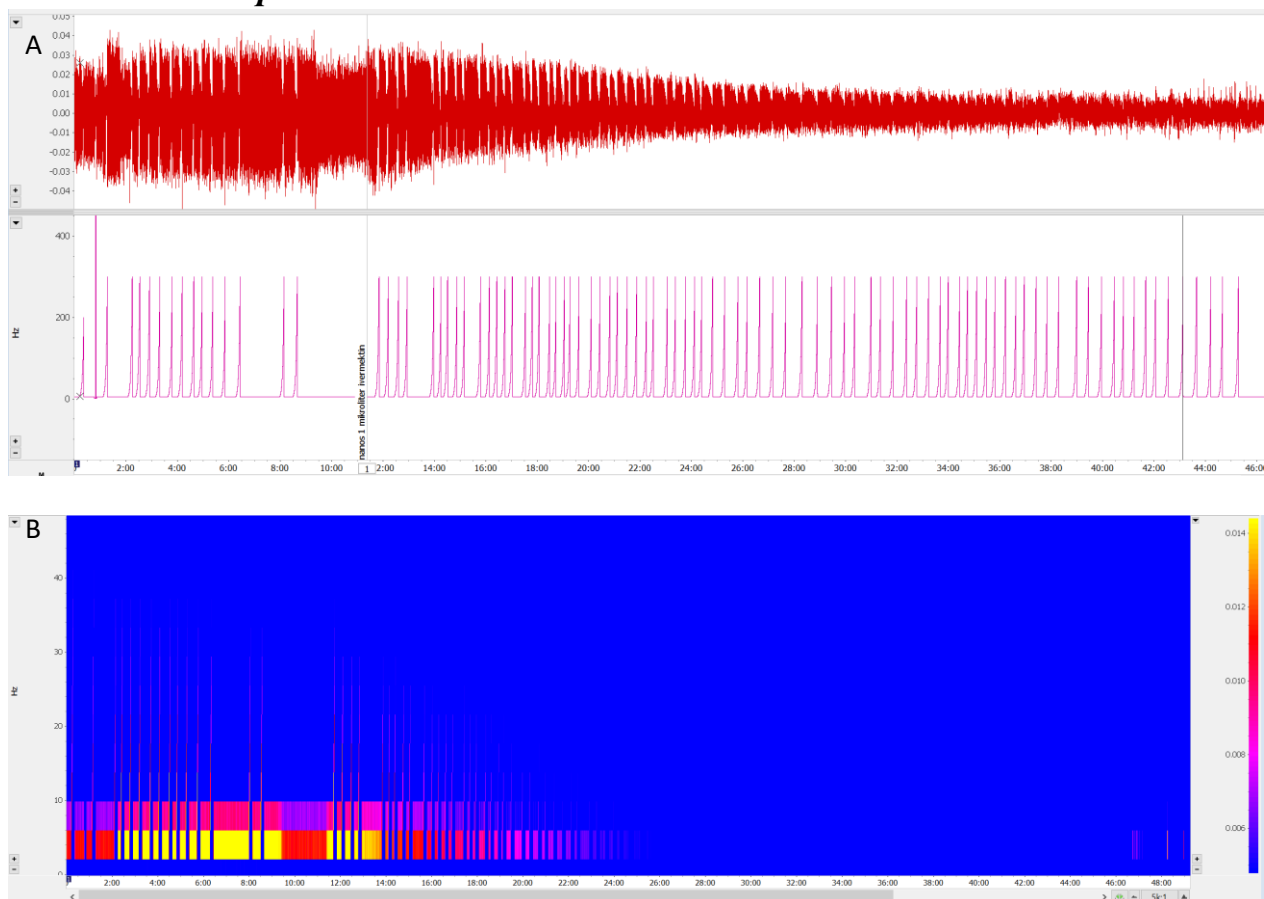
Slika 11: Stimulacijski graf velikosti ERG v odvisnosti od frekvence draženja po nanosu ivermektina.
Vir: Neža Kunič, 2023

Na simulacijskem grafu po nanosu ivermektina (Slika 11) so količine predstavljene z istimi barvami, kot v predhodnem. Graf signala iz fotoreceptorjev je identičen kot pri prejšnjem, lahko pa opazimo veliko razliko v intenziteti odziva LMC nevronov, amplituda v optimalnem delu delovanja, med 40 in 60 Hz, je namreč občutno manjša. Posledično to lahko opazimo na rdeči krivulji, kjer se lokalni maksimum pri 50 Hz slabše izrazi in je manjši zlasti v primerjavi z grafom pred nanosom IM.

5.2. Analiza rezultatov

V trajanju praktičnega dela raziskave, med marcem in junijem 2022, smo izmerili signale pri 6 osebkih in prav toliko vrstah žuželk. Vsak poskus je trajal vsaj 4 ure, od tega je meritev ERG potekala med 2 do 3 ure. Pri vsaki meritvi smo žuželko dražili z več zaporednimi vlaki bliskov s stopnjujočo gostoto. Vsak vlak dražljajev je na zapisu signalov viden kot rampa v kanalu, kjer je izračunana frekvenca draženja. Ob draženju z vlakom se ERG najprej poveča, potem pa pade do ravni šuma. Šum v ERG signalu je opazen med zaporednimi vlaki.

5.3. Muha trepetavka

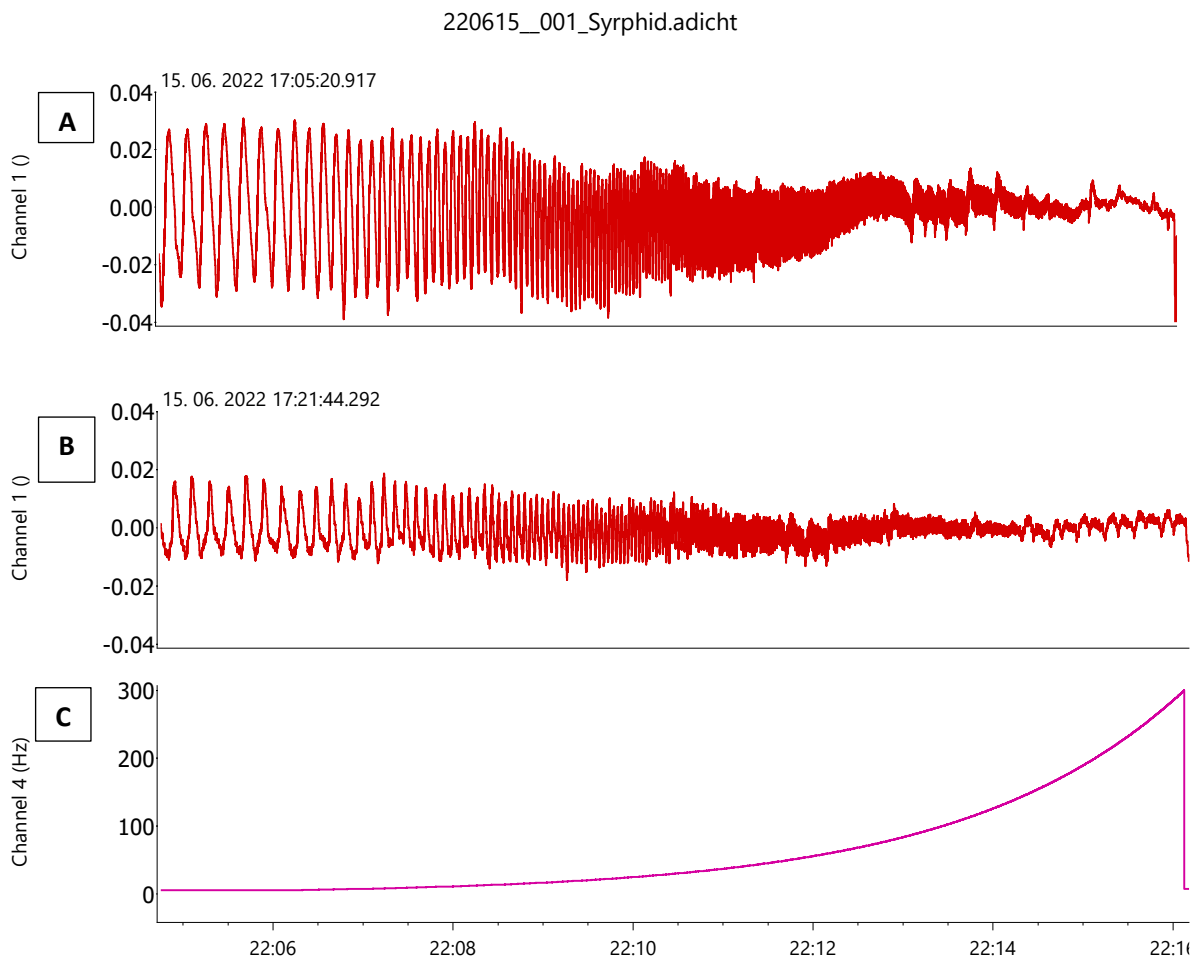


Slika 12: Vpliv aplikacije IM (pri času 11'40") na časovni potek odziva oči muhe (*Episyrphus balteatus*, Diptera: Syrphidae). A, časovni potek ERG (zgornja sled) ob draženju z vlaki sinusoidnih bliskov (frekvenca zapisana v spodnji sledi). Vsak vlak nastopi v času posamezne frekvenčne rampe. B, spektrogram ERG iz A.

Muho trepetavko (*Episyrphus balteatus*) smo dražili s sinusoidnimi bliski, ki so se stopnjevali od frekvenca 5 do 300 Hz. Slika 12 prikazuje celoten časovni potek poskusa, ki je trajal 47 minut. Zgornja sled na delu slike 12A ponazarja odziv muhe trepetavke na te sekvence bliskov, spodnja sled v delu 12A pa kaže zapis frekvence bliskov, ki jih je prožil

funkcijski generator. Slika 12B prikazuje spektrogram ERG signala iz 12A, izračunan v realnem času. Ob času 11 minut in 40 sekund smo na kutikulo živali nanegli ivermektin in opazovali spremembo zgornje sledi. Dve minuti pozneje je opazen upad velikosti signala iz oči trepetavke. Približno 18 minut po aplikaciji se je velikost signalov dokaj enakomerno manjšala. V 30. minuti (po začetku opravljanja poskusa) pa se je signal stabiliziral in do konca poskusa ohranil enako velikost.

Del slike B ponazarja spektrogram, kar je vizualna predstavitev signala pri različnih frekvencah, ki smo ga dobili iz oči muhe trepetavke. Na desni strani je dodana skala, ki prikazuje barvno kodiranje velikosti signala. V spektrogramu je viden upad signala nad 5 Hz približno 13 minut po začetku poskusa in dve minuti po nanosu ivermektina. Od tega časa se jakost signala zmanjšuje in na spektrogramu ob 24. minuti poskusa izgine sled signala.

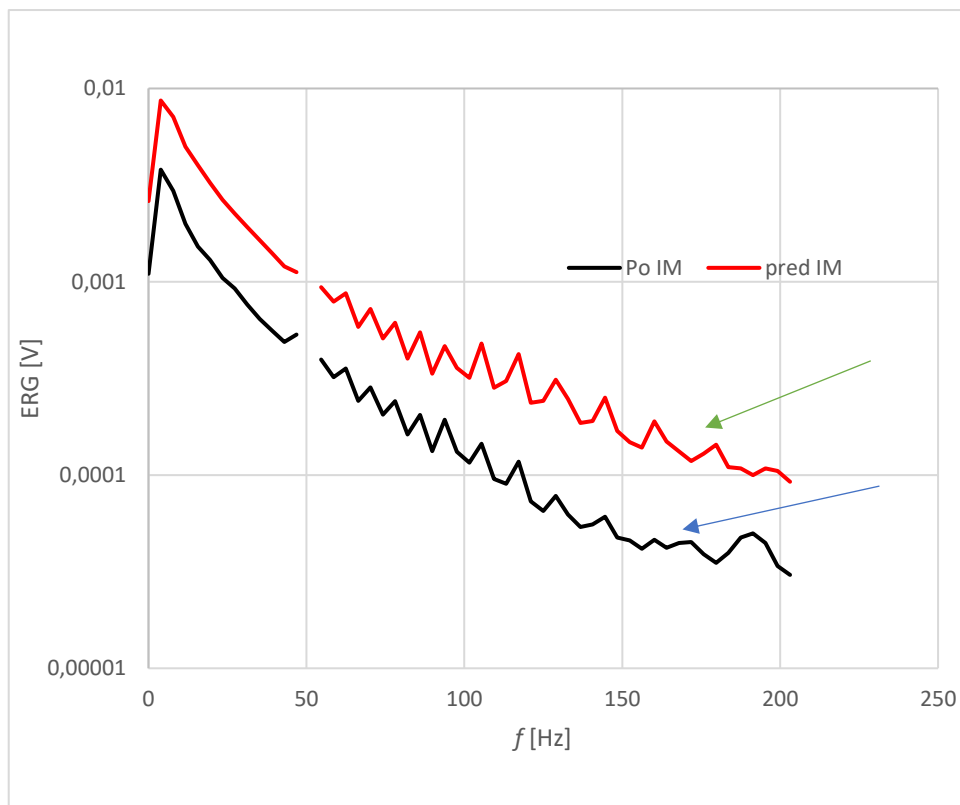


Slika 13: Vpliv aplikacije IM (pri času 11'40") na časovni potek ERG muhe (*Episyrphus balteatus*). A, ERG pred aplikacijo IM. B, ERG po aplikaciji IM. C, časovni potek frekvence sinusoidnega draženja.

Slika 13 je izsek iz slike 12 in prikazuje signal v času enega vlaka dražljajev. Sled na delu slike 13A ponazarja odziv muhe trepetavke na en vlak sinusoidnih bliskov, ki se je v 10 sekundah stopnjevala od 5 do 300 Hz. Električni signal iz oči s sinusoidnim nihanjem sledi časovnemu poteku dražljaja. Velikost ERG pada s frekvenco draženja. Sunkovite spremembe signala po ordinatni osi so artefakti, ki so posledica premikov žuželke. Ob odzivu v sliki 13A žival ni bila izpostavljena IM.

Sled na delu slike 13B ponazarja odziv iste živali na vlak bliskov, a tokrat pod vplivom IM. Velikost signala je vseskozi manjša, v primerjavi z odzivom pred nanosom IM. Med posameznimi vlaki bliskov je bila trepetavka namreč izpostavljena konstantnemu bliskanju s frekvenco 5 Hz, ki se kaže na začetku grafov iz dela slike 13A in 13B. Če primerjamo le

ta odziv vidimo občutno zmanjšanje v sledi 13B. Velikost signala upada pri nižjih frekvencah, kot v sliki 13A, ki ponazarja stanje živali po nanosu IM.

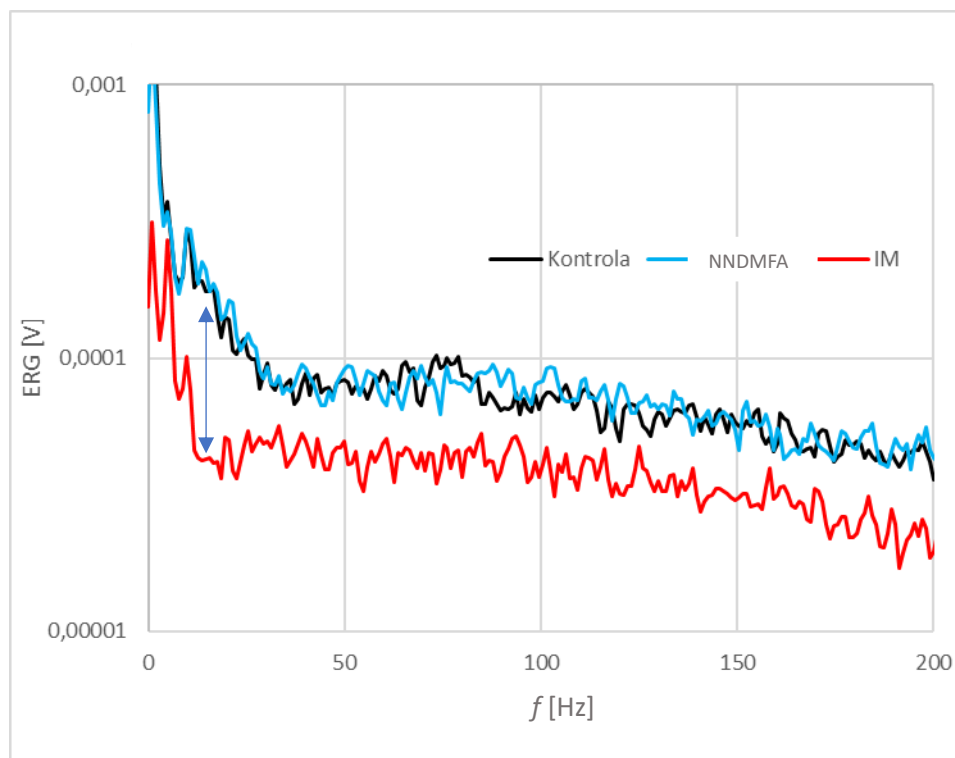


Slika 14: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja za muho trepetavko (*Episyrphus balteatus*). Puščici prikazujeta razliko med odzivoma LMC nevronov. Zelena puščica prikazuje odziv LMC nevronov pred aplikacijo IM. Modra puščica prikazuje odziv po aplikaciji IM.

Podatke iz spektrograma (Slika 12B) smo tabelirali in izvozili v preglednico. Slika 14 prikazuje odvisnost ERG signala od frekvence draženja v časovnem izseku v trajanju 1 s. Prikaz na sliki 14 ustreza vertikalnemu profilu spektrograma iz slike 12B. Na sliki 12B je velikost signala kodirana z barvo, na sliki 14 pa je prikazana s črtnim grafom, ki ima zaradi boljšega prikaza majhnih vrednosti logaritemsko ordinato. Graf je prekinjen pri 50 Hz, kjer se v signalu pojavi motnja iz omrežne električne napeljave.

ERG signal žuželke je sestavljen iz signala LMC nevronov ter fotoreceptorjev. Signal fotoreceptorjev ob draženju pada, medtem, ko signal iz LMC nevronov raste in doseže višek ob višji frekvenci in se nato znova zmanjša. Pri tem grafu je pomembna sprememba viška v odzivu nevronov. Z zeleno puščico je označen višek pred aplikacijo IM, z modro pa po aplikaciji. Tam je ta veliko manj očiten, kar je posledica slabšega odziva LMC nevronov muhe trepetavke. Celoten ERG odziv je zato manjši. Še vedno pa se pojavi ob enaki frekvenci draženja.

5.4. Čebela

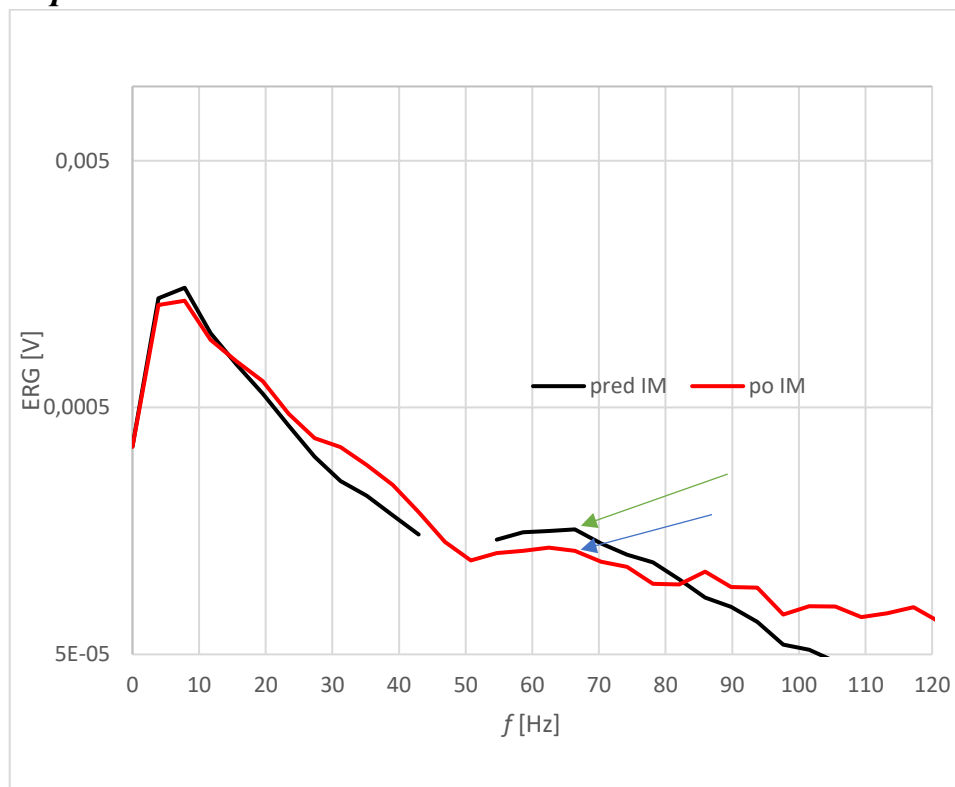


Slika 15: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja pri čebeli (*Apis mellifera*). Puščica prikazuje razliko v odzivu LMC.

Graf prikazuje velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja pri čebeli, ki smo jo dražili s sinusoidnimi bliski od 5 do 200 Hz, trajanje posameznega vlaka pa je trajalo 10 s. Stanje pred nanosom IM je označeno s črno barvo, stanje po nanosu pa z rdečo barvo. Poleg tega je z modro barvo označen odziv samo po nanosu topila (NNDMFA). Med črnim in modrim grafom je tako opaziti le malenkostne razlike, iz česar lahko sklepamo, da samo topilo na žival ni imelo učinka.

Lahko pa opazimo razliko odziva po nanosu IM, to nam prikazuje rdeči graf, ki je v celoti manjši kot pred nanosom. Še posebej lahko vidimo razliko v vrhu delovanja LMC nevronov, ki se pri čebeli pojavi pri okoli 20 Hz. Po nanosu je bil odziv občutno manjši.

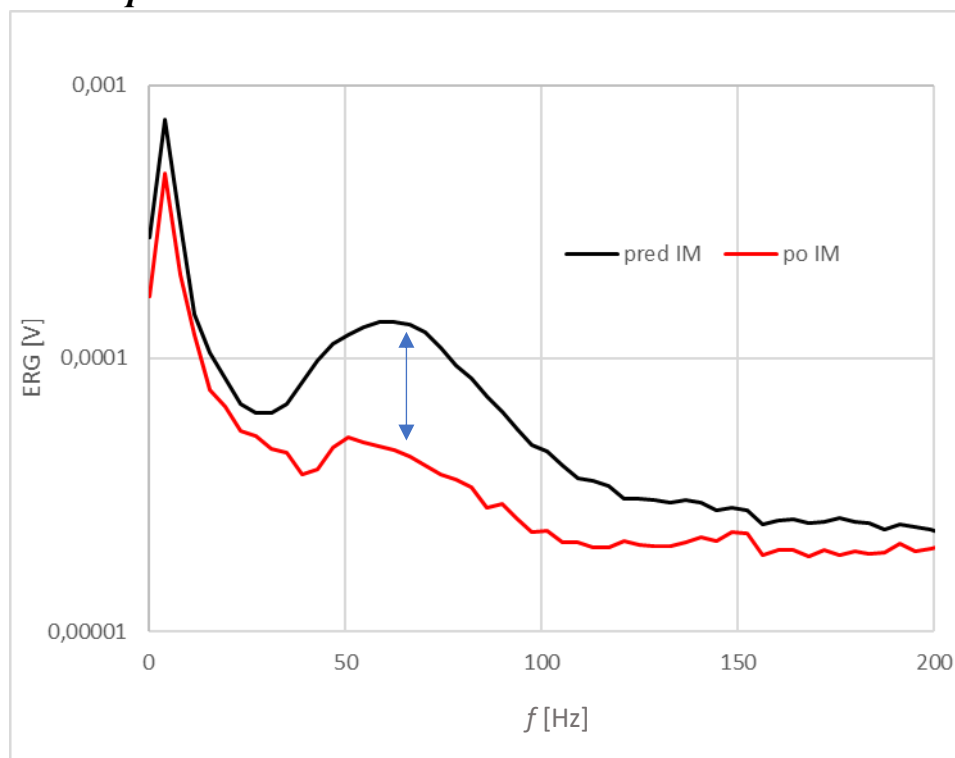
5.5. *Kapusov belin*



Slika 16: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja za vrsto kapusov belin (*Pieris brassicae*). Puščici prikazujeta razliko med odzivoma LMC nevronov. Zelena puščica prikazuje odziv LMC nevronov pred aplikacijo IM. Modra puščica prikazuje odziv po aplikaciji IM.

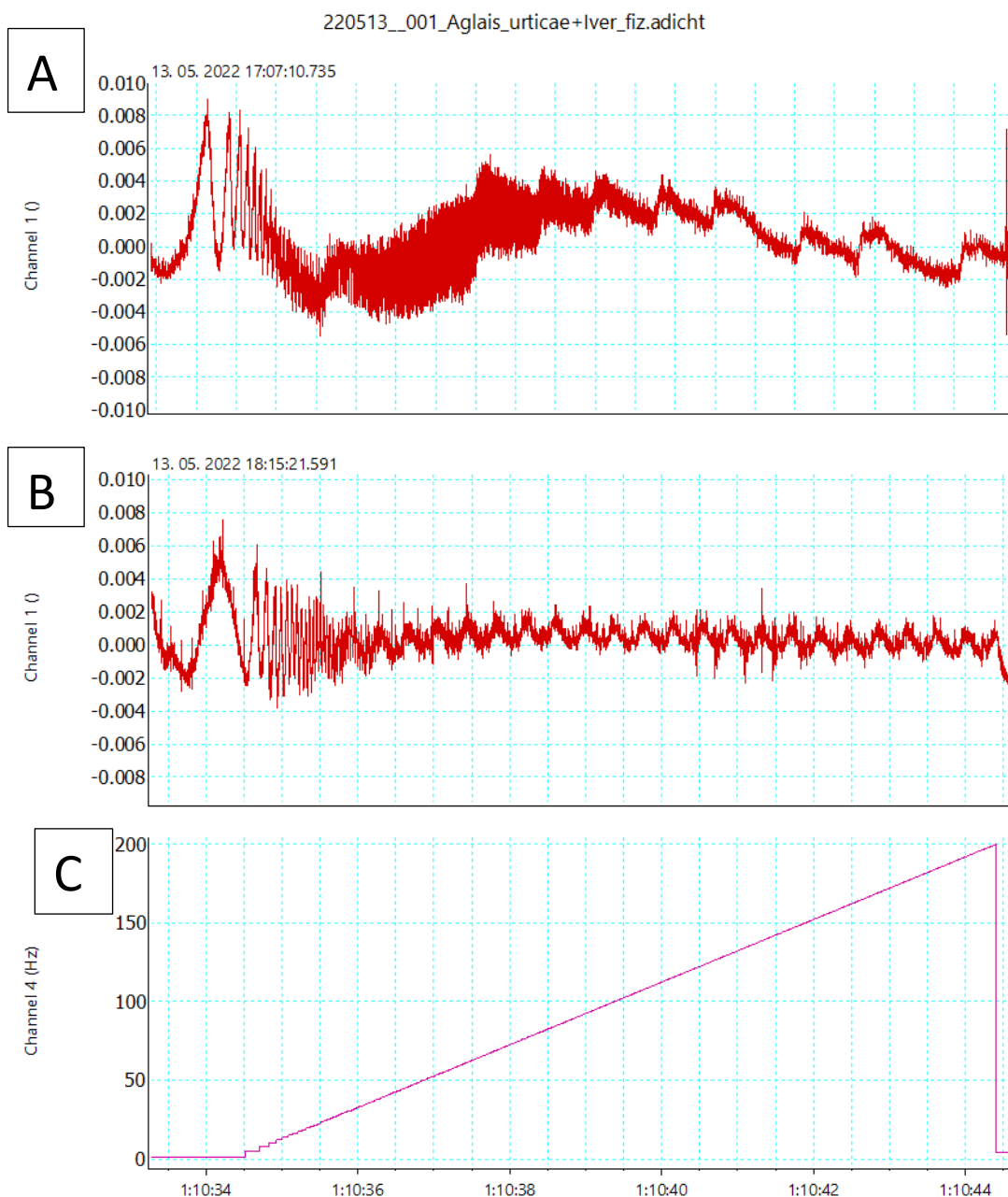
Graf prikazuje potek ERG signala pridobljenega ob draženju kapusovega belina. Črna sled prikazuje signal pred nanosom IM in rdeča po nanosu. Do razlike med njima pride v višku signala iz LMC nevronov živali. Oba se pojavita ob enaki frekvenci, in sicer ob približno 65 Hz. Vendar lahko v grafu pred nanosom opazimo, da je višek po nanosu upadel. To pomeni, da je bil pred nanosom IM signal iz LMC nevronov močnejši. Po izpostavljenosti živali IM je višek še vedno opazen, a v manjši meri. Črna krivulja je prekinjena pri 45 Hz, kjer se v signalu pojavi motnja iz omrežne električne napeljave.

5.6. Mali koprivar



Slika 17: Velikost ERG v odvisnosti od frekvence draženja za malega koprivarja (*Aglais urticae*) pred in po aplikaciji ivermektina. Modra puščica označuje izrazit upad velikosti v frekvenčnem pasu med 40 in 100 Hz.

Malega koprivarja smo dražili s sinusoidnimi bliski od 5 do 200 Hz, posamezen vlak pa je trajal 10 s. ERG signal je največji pri $f=5$ Hz in ima lokalni maksimum pri $f=70$ Hz. Signal je po nanosu IM izrazito upadel v območju okoli 70 Hz (označeno s puščico). Pri nizkih frekvencah (na območju okoli 5-10 Hz), je razlika v velikosti ERG pred in po aplikaciji manjša kot v pasu pri 70 Hz. Prav v tem pasu smo pričakovali vrh odziva LMC nevronov, zato lahko sklepamo, da IM deluje na prenos signalov iz fotoreceptorjev na LMC ali pa neposredno na LMC.



Slika 18: Vpliv aplikacije IM na časovni potek odziva oči malega koprivarja (*Aglais urticae*). A, ERG pred aplikacijo IM. B, po aplikaciji IM. C, časovni potek stopnjevanja frekvence sinusoidnega dražljaja.

Slika 18 prikazuje časovni izsek poskusa med časom 1:10:34 in 1:10:44. Na grafih lahko opazimo občutno razliko med odzivom metulja pred (18A) in po (18B) nanosu IM. Sinusoidni bliski so se v posameznem intervalu (10 s) namreč povečevali od 5 do 200 Hz. Pri nizkih frekvencah draženja žival zaznava vsak blisk posebej, pri visokih frekvencah se odzivi na zaporedne bliske zlijejo med seboj. To se na grafu kaže kot enakomeren odziv. Počasni ponavljajoči se odzivi v 18A in 18B so artefakti, posledica premikanja mišic v žuželki. Pri grafu 18B lahko tako opazimo zlitje odzivov pri nižji frekvenci draženja. To

pomeni, da je žival pod vplivom učinka IM veliko slabše zaznavala razliko med posameznimi bliski.

6. Diskusija

Za preučevanje učinka IM na električne signale čutnih celic smo uporabljali ERG in smo pred začetkom eksperimentalnega dela predvideli, da bo ta metoda dovolj robustna in bo zaznala spremembe. To hipotezo lahko potrdimo, kajti opazna je bistvena razlika med signalom, ki smo ga pridobili, preden so bili testni organizmi izpostavljeni IM ter signalom po nanosu sredstva. ERG je uspešno zaznal razliko v velikosti električnih signalov iz insektovih čutnih in živčnih celic, to razliko pa smo lahko jasno opazili na grafih. Ocenjujemo, da je bila metoda proučevanja z ERG uspešna.

Odločili smo se za topični nanos izbranega pesticida na testne organizme in s tem predvideli, da bo takšen nanos zadosten in se bodo pokazale spremembe v električnih signalih insektovih čutnih in živčnih celic. Tudi to hipotezo lahko potrdimo. Naneseni IM je namreč po pričakovanjih prodril v telo živali, kar smo lahko opazovali že tako, da se je kapljica IM s topilom, ki smo jo nanesli na kutikulo, vpila. Da je imel tak nanos zadosten učinek, pa se je pokazalo na prikazanih grafih. Po določenem času je videno zmanjšanje pridobljenega signala, kar lahko pripišemo le IM. Ker proučevani organizmi niso dobili IM na noben drug način, potrjujemo, da je hemolimfa živali prenesla sredstvo po telesu, tako da so bile zaznane posledice v čutnih in živčnih celicah in s tem je hipoteza potrjena.

Naš eksperiment je potekal na dveh vrstah metuljev (*Pieris brassica*, *Aglais urticae*), eni čebeli (*Apis mellifera*) in eni muhi trepetavki (Diptera: Syrphidae; *Episyrphus balteatus*). Predvideli smo, da bodo učinki IM opazni pri vseh teh organizmih. To hipotezo lahko bolj ali manj potrdimo. Pokazale so se namreč razlike v tem, kolikšen vpliv je IM imel na posamezen organizem. Za najbolj občutljivo se je izkazala čebela, pri kateri smo opazili največji upad signala. Najhitreje pa smo spremembe opazili pri muhi trepetavki (kar tudi pripisujemo dejstvu, da je bila najmanjša od testiranih živali) in sicer dve minuti po nanosu IM, medtem, ko je pri ostalih organizmih trajalo 20 minut, da smo opazili spremembe v signalu. IM pa je imel najmanjši vpliv na metulja vrste kapusov belin (*Pieris brassica*). Kljub temu smo našo hipotezo potrdili, saj je bil vpliv IM viden pri vseh organizmih, četudi se je velikost le-tega razlikovala. Ne moremo pa prevzeti, da te proučevani posamezniki predstavljajo svojo celo vrsto, saj je bila raziskava izvedena na premajhnem številu osebkov, da bi prišli do teh zaključkov. Če bi želeli opazovati vpliv IM na vrsto, bi bile smiselne raziskave v katerih je udeleženih po več osebkov iste vrste.

Da bi omogočili topičen nanos IM, ki je v trdnem agregatnem stanju, smo uporabljali nepolarno topilo NNDMFA in s tem predpostavili, da to sredstvo samo ne bo imelo vpliva na vid insekta. Tudi to hipotezo potrjujemo. Izvedli smo več kontrolnih poskusov, pri katerih smo na žival nanесли le NNDMFA in pri teh razlike v signalu ERG ni bilo (glej Slika 15). Signal je bil enak pred in po nanosu topila, ki smo ga na testiranem insektu opazovali 20 minut. Po tem času bi se spremembe v vidu žuželke že opazile. Zato smo lahko NNDMFA uporabljali kot nepolarno topilo in obenem opazovali le učinke IM.

IM ni najbolj razširjen ali nevaren pesticid prisoten v naravi, a za njegovo uporabo smo se odločili zaradi lažje dostopnosti in manjše toksičnosti, saj smo morali skrbeti za lastno varnost pri opravljanju eksperimenta. Z njegovo uporabo smo predvideli, da bo ta imel negativen učinek na vid živali. Pričakovali smo zmanjšanje signala predvsem iz LMC nevronov insekta. To hipotezo potrjujemo, kajti na vseh raziskanih osebkih se vidi jasen upad signala iz živčnih in čutnih celic. Pri večini testnih insektov se je učinek IM pokazal po približno 20 minutah, pri nekaterih prej, pri vseh pa smo učinek opazovali kot zmanjšanje signala ERG. Ko smo v signalu ERG opazovali posamezne komponente (signal čutnih celic in signal LMC) je bil jasen predvsem upad signala v območju frekvenc, kjer imajo optimum delovanja LMC nevroni. Na slikah grafov 14, 15, 16 in 17 se jasno vidi kako se je prispevek LMC zmanjšal, ker je IM večinoma deloval na te živčne celice.

Poskuse smo izvajali na različnih vrstah živali. Rezultati so bili pri vseh živalih konsistentni, vseeno pa so se pri različni vrsti učinki pokazali različno očitno. Recimo pri malem koprivarju (*Aglaia urticae*) so bili rezultati veliko bolj vidni kot pri kapusovem belinu (*Pieris brassicae*). S tem smo sami preverili Kroghovo načelo (Donahue, 2018), ki pravi, da bo za tako veliko število problemov vedno na voljo vrsta živali, ali nekaj vrst živali, na katerih bo tisti problem najbolj priročno proučevati (Donahue, 2018). V našem primeru je bila žival, ki je prikazala najbolj vidne rezultate, mali koprivar.

Pri tem lahko tudi izpostavimo, da smo se predhodno že navezovali na prejšnji študiji (Liu in sod., 2021; Chen in sod., 2018), ki sta se ukvarjali s proučevanjem vpliva toksinov na vid, vendar je bil testni organizem le vinska mušica (*Drosophila melanogaster*). Mi smo testirali več različnih vrst opráševalcev. To, da smo si za raziskovanje izbrali različne vrste žuželk, ni bilo naključje, vpliv ivermektina smo namreč želeli opazovati pri različnih organizmih, ki živijo v ekosistemih, ki nas obkrožajo in so pomembni pri opráševanju, in smo s tem nalogo tudi aktualizirali. Poleg tega je bil pri naši nalogi nanos ivermektina drugačen, kot pri prejšnjih študijah. Nanos, ki smo si ga sami izbrali, je bil preko kutikule, saj pridejo na takšen

način žuželke tudi v naravi v stik s pesticidi. Pri prejšnjih študijah so toksine živali prejele oralno. V omenjenih študijah je bil vpliv toksinov slabše opazen, kot pri naši študiji. Menimo, da zato, ker so v raziskavi dražili žival le z enakimi, od 2 do 6 s dolgimi bliski na eni sami, nizki frekvenci, v naših raziskavah pa smo to nadgradili v vlak, ki je trajal 10 s in je obsegal razpon od 5 do 200 Hz (oziroma do 300 Hz), s frekvenčno analizo signalov pa smo lahko selektivno opazovali spremembe v delovanju fotoreceptorjev in LMC.

7. Zaključek

Z našimi preiskavami smo potrdili negativen učinek ivermektina na vid opráševalcev. Ker so insekti v naravi pesticidom izpostavljeni zlasti topično, smo se tudi sami lotili enakega pristopa, ki se je izkazal za učinkovitega. Po nanosu na kutikulo in merjenju rezultatov s pomočjo signala ERG smo ugotovili, da sta bili najbolj občutljivi na pesticid čebela in muha trepetavka, obe predstavnici vrst, ki spadajo med najbolj pomembne opráševalce. Na podlagi tega potrjujemo, da je vpliv ivermektina na žuželke negativen, saj s tem, ko poslabša njihove čutne in živčne celice, zmanjša njihovo sposobnost opráševanja. Kopičenje tega sredstva v naravi je prav zaradi tega razloga škodljivo za ekosisteme, kajti le-ti brez opráševalcev ne morejo preživeti. Če bi se število opráševalcev v naravi bistveno zmanjšalo, bi posledice čutili tudi ljudje in zato je velikega pomena skrb za okolje in preprečevanje kopičenja sredstev, kot je ivermektin, v naravi. Ivermektin gotovo vpliva tudi na druge organizme, ki ne spadajo med opráševalce, pa so vseeno pomembni členi v ekosistemih. Raziskava je bila pilotska, saj smo vanjo vključili majhno število organizmov. Poleg tega se moramo zavedati dejstva, da rezultatov za posamezen testiran organizem ne smemo in ne moremo posplošiti na celotno vrsto. To bi bilo možno, če bi testirali veliko količino predstavnikov iste vrste. Kljub temu naše ugotovitve dajo iztočnice za nadaljnje raziskave. Poskuse bi lahko izvedli še na več vrstah opráševalcev, tudi z drugimi pesticidi. Prav tako bi bilo zanimivo opazovati od vida odvisno vedenje opráševalcev pod vplivom ivermektina, na primer ali se spremeni njihova zmožnost razlikovanja med različnimi barvami cvetov, in ali prihaja do sprememb v načinu njihovega gibanja.

8. Viri in literatura

- Barron, A. B., Oldroyd, B. P., & Ratnieks, F. L. (2001). Worker reproduction in honey-bees (Apis) and the anarchic syndrome: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50, 199-208.
- Batra, S. W. T. (1995). Bees and pollination in our changing environment. *Apidologie*, 26(5), 361-370.
- Bees*. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:
<https://www.nwf.org/Educational-Resources/Wildlife-Guide/Invertebrates/Bees>.
- Belušič, G. *Vpliv pesticidov na vid organizma*. [intervju]. Pridobljeno: 23. 1. 2023.
- Buschbeck, E. K., & Friedrich, M. (2008). Evolution of insect eyes: tales of ancient heritage, deconstruction, reconstruction, remodeling, and recycling. *Evolution: Education and Outreach*, 1, 448-462.
- Butterfly ecology*. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:
<https://www.oxfordbibliographies.com/display/document/obo-9780199830060/obo-9780199830060-0127.xml#obo-9780199830060-0127-bibItem-0004>.
- Butterfly life cycle*. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:
<https://ansp.org/exhibits/online-exhibits/butterflies/lifecycle/>.
- Chanda, S., & Mehendale, H. M. (2005). Acetylcholine.
- Chen, M. Y., Liu, H. P., Liu, C. H., Cheng, J., Chang, M. S., Chiang, S. Y., ... & Lin, W. Y. (2018). DEHP toxicity on vision, neuromuscular junction, and courtship behaviors of *Drosophila*. *Environmental Pollution*, 243, 1558-1567.
- Das, A., Sau, S., Pandit, M. K., & Saha, K. (2018). A review on: Importance of pollinators in fruit and vegetable production and their collateral jeopardy from agro-chemicals. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), 1586-1591.
- David Burnie. *Ilustrirana enciklopedija živali*. 2010. Tržič: Učila International.
- De França, S. M., Breda, M. O., Barbosa, D. R., Araujo, A. M., Guedes, C. A., & Shields, V. D. C. (2017). The sublethal effects of insecticides in insects. *Biological control of pest and vector insects*, 23-39.

- de Souza, R. B., & Guimarães, J. R. (2022). Effects of Avermectins on the Environment Based on Its Toxicity to Plants and Soil Invertebrates—a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(7), 259. Egg laying by a butterfly on a fragmented host plant: a multi-level approach. S.G. Rabasa. 2005. [internet]. [Citirano: 14. 1. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2005.0906-7590.04229.x>.
- Dobson, H. E. (2006). Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In *Biology of floral scent* (pp. 147-198). CRC press.
- Donahue, S. W. (2018). Krogh's principle for musculoskeletal physiology and pathology. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 18(3), 284.
- Dourmishev, A. L., Dourmishev, L. A., & Schwartz, R. A. (2005). Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *International journal of dermatology*, 44(12), 981-988.
- Doyle, T., Hawkes, W. L., Massy, R., Powney, G. D., Menz, M. H., & Wotton, K. R. (2020). Pollination by hoverflies in the Anthropocene. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1927), 20200508.
- Electroretinogram. H. L. Ramkumar. 2022. [internet]. [Citirano: 24. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://eyewiki.aao.org/Electroretinogram>.
- Environmental hazards & health effects (Cancer Clusters). [internet]. [Citirano: 24. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://www.cdc.gov/nceh/clusters/fallon/organophosfaq.htm>.
- Friberg, M., Aalberg Haugen, I. M., Dahlerus, J., Gotthard, K., & Wiklund, C. (2011). Asymmetric life-history decision-making in butterfly larvae. *Oecologia*, 165, 301-310.
- Genung, M. A., Fox, J., Williams, N. M., Kremen, C., Ascher, J., Gibbs, J., & Winfree, R. (2017). The relative importance of pollinator abundance and species richness for the temporal variance of pollination services. *Ecology*, 98(7), 1807-1816.
- Hazan, S. (2022). Microbiome-Based Hypothesis on Ivermectin's Mechanism in COVID-19: Ivermectin Feeds Bifidobacteria to Boost Immunity. *Frontiers in Microbiology*, 13, 952321.

Hover flies. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:

<https://www.sanbi.org/animal-of-the-week/hover-flies/>.

Ivermectin. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:

<https://go.drugbank.com/drugs/DB00602>.

Kapusov belin. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:

https://sl.wikipedia.org/wiki/Kapusov_belin.

Katagi, T. (2006). Behavior of pesticides in water-sediment systems. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews, 133-251.

Kogos, L. C., Li, Y., Liu, J., Li, Y., Tian, L., & Paiella, R. (2020). Plasmonic ommatidia for lensless compound-eye vision. Nature communications, 11(1), 1637.

Kranjska čebela. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:

<https://www.genska-banka.si/pasme/kranjska-cebela/>.

Liu, H. P., Cheng, J., Chen, M. Y., Chuang, T. N., Dong, J. C., Liu, C. H., & Lin, W. Y. (2022). Neuromuscular, retinal, and reproductive impact of low-dose polystyrene microplastics on *Drosophila*. Environmental Pollution, 292, 118455.

Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2012). Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. Frontiers in molecular neuroscience, 5, 60.

McArthur, M. J., & Reinemeyer, C. R. (2014). Herding the US cattle industry toward a paradigm shift in parasite control. Veterinary parasitology, 204(1-2), 34-43.

Metulji. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://www.notranjski-park.si/izobrazevalne-vsebine/zivalski-svet/metulji>.

Navadna zimna trepetavka (Episyrphus balteatus). [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023].

Dostopno na naslovu: <https://www.urbanatura.si/vsebina/1809>.

Navodila za vaje iz Fiziologije živali za Izbirni praktikum za sistem Lt LabStation: učno gradivo za študente 3. letnika BSc Biologija, Biotehniška fakulteta, UL. G. Belušič, A. Škorjanc. 2021. [internet]. [Citirano: 24. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://accounts.kuracloud.com/user/login>.

- Requier, F., Garnery, L., Kohl, P. L., Njovu, H. K., Pirk, C. W., Crewe, R. M., & Steffan-Dewenter, I. (2019). The conservation of native honey bees is crucial. *Trends in ecology & evolution*, 34(9), 789-798.
- Robb, E. L., & Baker, M. B. (2017). Organophosphate toxicity.
- Rotheray, G. E., & Gilbert, F. (2011). The natural history of hoverflies.
- Stowasser, A., Mohr, S., Buschbeck, E., & Vilinsky, I. (2015). Electrophysiology meets ecology: investigating how vision is tuned to the life style of an animal using electroretinography. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 13(3), A234.
- Stromectol*. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=681888c9-af79-4b7d-ae80-c3f4f6f1effd&audience=consumer>.
- Syrphids (Flower Flies, or Hover Flies)*. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://ipm.ucanr.edu/natural-enemies/syrphids/>.
- Tewari, T., & Mukherjee, S. (2010). Microdosing: concept, application and relevance. *Perspectives in Clinical Research*, 1(2), 61.
- The Electroretinogram: ERG. I. Perlman. 2007. [internet]. [Citirano: 24. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11554/>.
- The importance of pollinators. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: <https://promotepollinators.org/about/importance-of-pollinators/>.
- Veldtman, R., McGeoch, M. A., & Scholtz, C. H. (2007). Fine-scale abundance and distribution of wild silk moth pupae. *Bulletin of Entomological Research*, 97(1), 15-27.
- Veliko hrupa za nič ali kako je ivermektin postal medijska zvezda*. [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu: https://www.kclj.si/index.php?dir=/ukc_ljubljana/mediji_in_javnost/sporocila_za_javnost/arhiv&id=6219.
- Verlagsbüro Kopp. *Novi veliki leksikon živali*. 2008. Ljubljana: Založba Narava.

What is a pollinator? [internet]. [Citirano: 10. 2. 2023]. Dostopno na naslovu:
<https://www.nps.gov/subjects/pollinators/what-is-a-pollinator.htm>.