

# Procjena utjecaja otpadnih voda na kakvoću vode rijeke Krke i specifične biomarkere potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)

---

Veseli, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:819246>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marina Veseli

**Procjena utjecaja otpadnih voda na kakvoću vode rijeke  
Krke i specifične biomarkere potočne pastrve (*Salmo  
trutta* Linnaeus, 1758)**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala, na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Vlatke Filipović Marijić te uz suvoditelja izv. prof. dr. sc. Jasnu Lajtner, s Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra Ekologije i zaštite prirode.

## **Zahvale**

*Najljepše se zahvaljujem mentoricama dr. sc. Vlatki Filipović Marijić s Instituta Ruđer Bošković i izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na pruženoj mogućnosti, potpori i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se na izdvojenom vremenu, susretljivosti i strpljenju.*

*Zahvaljujem se i svim profesorima, asistentima i djelatnicima Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koji su mi omogućili kvalitetno i nadasve ugodno studiranje u proteklih 5 godina. Bilo je ovo divno iskustvo.*

*Veliko hvala svim članovima Laboratorija za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na pomoći i savjetima prilikom provedbe istraživanja za ovaj rad.*

*Puno hvala Tanji na pomoći u laboratorijskom radu i bezrezervnoj podršci i savjetima prilikom pisanja rada.*

*Veliko hvala i mojim "Štrebericama" i ostalim kolegama i prijateljima s preddiplomskog i diplomskog studija s kojima je svako polaganje ispita bilo puno lakše, a svaki praktikum puno zabavniji.*

*Puno hvala i kolegama i prijateljima iz Udruge studenata biologije – BIUS na svim suradnjama, razmjeni iskustva, pomoći i zajedničkim uspomenama.*

*Hvala mom bratu Igoru na pomoći i potpori tijekom cijelog mog školovanja, na objašnjavanju matematike preko telefona i pružanju ekspresne doze realnosti kad je to potrebno. Puno hvala i Zagi koja je uvijek tu kad zatreba.*

*Hvala baki i dedi na igri, zabavi, razgovorima, savjetima i potpori.*

*Hvala mom Peri na velikoj podršci tijekom svih ovih godina. Hvala na razumijevanju, odricanju i ljubavi.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, Snježani i Dušanu, bez kojih ovo ništa ne bi bilo moguće. Hvala vam i ovaj rad posvećujem vama!*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Procjena utjecaja otpadnih voda na kakvoću vode rijeke Krke i specifične biomarkere potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)**

Marina Veseli  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Donji dio toka rijeke Krke proglašen je nacionalnim parkom zbog svojih prirodnih bogatstava. Međutim, samo 2 km uzvodno od granice parka nalaze se točkasti izvori zagađenja uz grad Knin, tehnološke i komunalne otpadne vode koje se bez adekvatnog pročišćavanja ispuštaju u okolne vodotoke te ugrožavaju i pitku vodu obližnjeg stanovništva. U svrhu procjene njihovog utjecaja na biotu rijeke Krke, u potočnoj pastrvi (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) su određene koncentracije metala u mišiću, koje potvrđuju njezinu sigurnu konzumaciju u ljudskoj prehrani. Izloženost zagađivalima procjenjena je i određivanjem biomarkera te je uočena inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze u mišiću riba ulovljenih kod Knina u odnosu na izvor, što potvrđuje izloženost zagađivalima, dok koncentracije malondialdehida u jetri ne ukazuju na oksidativni stres. Analize vode su potvrdile pogoršanje ekološkog stanja za pojedine fizikalno-kemijske čimbenike uz grad Knin te iako konzumacija pastrve ne ugrožava ljudsko zdravlje, potrebno je provoditi monitoring rijeke Krke u svrhu praćenja kakvoće vode i procjene rizika za floru i faunu.

(57 stranica, 19 slika, 3 tablice, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biomonitoring, metali, acetilkolinesteraza, malondialdehid, grad Knin

Voditelj: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić  
Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner  
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner  
doc. dr. sc. Sunčica Bosak  
doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 08.01.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Evaluation of the wastewater effluent impact on the Krka River water quality and on specific biomarkers of the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)**

Marina Veseli  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Due to its exceptional natural value, downstream watercourse of the Krka River was proclaimed National Park. However, only 2 km upstream from the Park borders there are point sources of pollution near the Town of Knin, technological and municipal wastewaters, which are released without proper purification treatment in the surrounding watercourses, endangering the drinking water of the local community. In order to estimate their influence on the biota of the Krka River, metal concentrations were determined in muscle tissue of the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and their levels confirmed safe consumption of fish in human nutrition. Contaminant exposure was also evaluated by biomarker responses, which showed inhibition of acetylcholinesterase activity in muscle of fish caught near Knin compared to the Krka River spring, indicating pollution impact, while the concentration of malondialdehyde in the liver did not confirm oxidative stress. Water analyses pointed to deteriorated ecological water status regarding several physico-chemical parameters near the Town of Knin. Although trout consumption does not endanger human health, monitoring of the Krka River should be conducted in order to assess the water quality and potential risk for flora and fauna.

(57 pages, 19 figures, 3 tables, 75 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: biomonitoring, metals, acetylcholinesterase, malondialdehyde, Town of Knin

Supervisor: Dr. Vlatka Filipović Marijić

Cosupervisor: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Suncica Bosak, Asst. Prof.

Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Thesis accepted: 08.01.2018.

## Sadržaj

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                                                        | 1  |
| 1.1. Litički sustavi i onečišćenje .....                                                            | 1  |
| 1.1.1. Kapacitet i opterećenje ekosustava .....                                                     | 1  |
| 1.1.2. Tipovi zagađivača .....                                                                      | 2  |
| 1.2. Metali .....                                                                                   | 3  |
| 1.2.1. Esencijalni i neesencijalni metali i toksičnost.....                                         | 5  |
| 1.2.2. Bioakumulacija metala .....                                                                  | 6  |
| 1.2.3. Biološki učinci metala .....                                                                 | 7  |
| 1.3. Ribe kao bioindikatorski organizam .....                                                       | 7  |
| 1.4. Ribe u prehrani ljudi .....                                                                    | 8  |
| 1.4.1. Potočna pastrva .....                                                                        | 9  |
| 1.5. Biomarkeri izloženosti riba metalima .....                                                     | 10 |
| 1.5.1. Biomarker oksidativnog stresa – malondialdehid .....                                         | 10 |
| 1.5.2. Biomarker izloženosti organofosfatima i pojedinim metalima –<br>acetilkolinesteraza .....    | 11 |
| 1.6. Ciljevi istraživanja .....                                                                     | 11 |
| 2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA .....                                                                      | 13 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....                                                                         | 15 |
| 3.1. Prikupljanje uzoraka .....                                                                     | 15 |
| 3.1.1. Uzorkovanje jedinki riba .....                                                               | 15 |
| 3.1.2. Određivanje biometrijskih pokazatelja riba .....                                             | 15 |
| 3.1.3. Prikupljanje uzoraka vode .....                                                              | 16 |
| 3.2. Određivanje fizikalno-kemijskih čimbenika vode .....                                           | 16 |
| 3.3. Priprema tkiva za mjerenje metala i biomarkera .....                                           | 16 |
| 3.4. Mjerenje koncentracija metala u vodi i mišiću pastrve .....                                    | 18 |
| 3.5. Mjerenje koncentracija ukupnih proteina u postmitohondrijskoj frakciji mišića<br>pastrve ..... | 20 |

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5. Mjerenje biomarkera AChE u mišiću potočne pastrve .....                                                                    | 21 |
| 3.6. Mjerenje biomarkera MDA u jetri potočne pastrve .....                                                                      | 22 |
| 3.7. Statistička obrada podataka .....                                                                                          | 23 |
| 4. REZULTATI .....                                                                                                              | 25 |
| 4.1. Procjena kakvoće vode rijeke Krke .....                                                                                    | 25 |
| 4.1.1. Fizikalno kemijski čimbenici .....                                                                                       | 25 |
| 4.1.2. Metali u vodi .....                                                                                                      | 28 |
| 4.2. Biometrijski pokazatelji jedinki potočne pastrve.....                                                                      | 30 |
| 4.3. Metali u mišiću pastrve.....                                                                                               | 32 |
| 4.4. Biomarkeri .....                                                                                                           | 35 |
| 4.3.1. Acetilkolinesteraza i ukupni proteini .....                                                                              | 36 |
| 4.3.2. Malondialdehid.....                                                                                                      | 37 |
| 5. RASPRAVA.....                                                                                                                | 38 |
| 5.1. Kakvoća vode rijeke Krke na temelju fizikalno-kemijskih čimbenika i koncentracija<br>ukupno otopljenih metala u vodi ..... | 38 |
| 5.1.1. Fizikalno-kemijski čimbenici .....                                                                                       | 39 |
| 5.1.2. Metali u vodi rijeke Krke .....                                                                                          | 41 |
| 5.2. Bioakumulacija metala u mišiću pastrva i procjena prehrambene sigurnosti.....                                              | 43 |
| 5.3. Procjena utjecaja onečišćenja na biotu praćenjem biometrijskih pokazatelja i<br>biomarkera .....                           | 45 |
| 6. ZAKLJUČAK.....                                                                                                               | 48 |
| 7. LITERATURA .....                                                                                                             | 50 |
| ŽIVOTOPIS .....                                                                                                                 | 57 |



## POPIS KRATICA

|           |                                                                                                                                                           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AChE      | eng. <i>acetylcholinesterase</i> , acetilkolinesteraza                                                                                                    |
| BSA       | eng. <i>bovine serum albumin</i> , albumin goveđeg serum                                                                                                  |
| BHT       | butilirani hidroksitoluen                                                                                                                                 |
| DNA       | eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina                                                                                         |
| DTNB      | 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina                                                                                                                    |
| DTT       | ditiotreitol                                                                                                                                              |
| EPA       | eng. <i>US Environmental protection agency</i> , Agencija za zaštitu okoliša<br>Sjedinjenih Američkih Država                                              |
| GSI       | gonadosomatski indeks                                                                                                                                     |
| HR ICP-MS | eng. <i>High Resolution Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> ,<br>maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom<br>plazmom |
| HSI       | hepatosomatski indeks                                                                                                                                     |
| KI        | kondicijski indeks                                                                                                                                        |
| KPK       | kemijska potrošnja kisika                                                                                                                                 |
| LEU       | leupeptin                                                                                                                                                 |
| MDA       | eng. <i>malondialdehyde</i> , malondialdehid                                                                                                              |
| PMF       | postmitohondrijska frakcija                                                                                                                               |
| S.D.      | standardna devijacija                                                                                                                                     |
| TBA       | tiobarbituratna kiselina                                                                                                                                  |
| TCA       | trikloroctena kiselina                                                                                                                                    |
| TDS       | eng. <i>total dissolved solids</i> , ukupno otopljene soli                                                                                                |
| TEP       | 1,1,3,3-tetraetoksi-propan                                                                                                                                |
| TNB       | 5-tio-2-tionitrobenzojev kiseli anion                                                                                                                     |
| WHO       | eng. <i>World Health Organization</i> , Svjetska<br>zdravstvena organizacija                                                                              |

# 1. UVOD

## 1.1. Litički sustavi i onečišćenje

Vodeni ekosustavi predstavljaju najraznolikije zajednice živih organizama i zbog toga ih je nužno zaštititi. Litički sustavi ili tekućice se od ostalih vodenih ekosustava razlikuju po protočnosti, odnosno u ovim vodenim sustavima voda se kreće od izvora prema ušću pod utjecajem sile teže, a najčešće se održavaju padalinama, podzemnim vodama ili otapanjem ledenjaka. Obilježja svih tekućica su dinamičnost i variranje uvjeta u različitim dijelovima rijeke ili potoka što doprinosi velikoj raznolikosti njihove faune i flore. Rijeke su od izuzetne važnosti za ljude, jer se koriste za navodnjavanje, pitku vodu, proizvodnju električne energije, rekreaciju te zbog toga predstavljaju izrazito bitan resurs. Međutim, rijeke su pod velikim antropogenim utjecajem zbog ulijevanja nedovoljno pročišćenih komunalnih ili industrijskih otpadnih voda te odlaganja otpada i nesavjesnog korištenja umjetnih gnojiva u slivnom području rijeka. Unos toksičnih tvari u rijeke ne ugrožava samo floru i faunu rijeke, već ima značajan utjecaj i na zdravlje ljudi (Crompton, 2007). Iako prehrana morskom ribom i drugim morskim organizmima prevladava u većini dijelova svijeta, u nekim predjelima upravo riječni organizmi, prvenstveno ribe, predstavljaju značajan udio u prehrani te je to još jedan važan razlog zašto se onečišćenje rijeka i slatkovodnih sustava treba posebno istraživati.

### 1.1.1. Kapacitet i opterećenje ekosustava

Svaki ekosustav ima svoj kapacitet, odnosno sposobnost da prihvati i održava populaciju koja obitava na tom području i podnosi ukupno djelovanje te populacije na sustav, bez da to rezultira onečišćenjem okoliša ili ugrožavanjem bilo koje sastavnice okoliša (Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja, 2003). Do onečišćenja dolazi kada je pritisak onečišćivača na okoliš i ukupni antropogeni utjecaj prevelik, odnosno premašuje prihvatni kapacitet ekosustava (Chiras, 2005).

Vodeni ekosustavi su specifični po tome što voda kao medij povezuje sve žive organizme koji obitavaju u njima i zbog toga je njihova osjetljivost na zagađenje veća u odnosu na kopnene ekosustave. Opterećenje vodenog sustava je ljudska djelatnost koja direktno ili posljedično utječe na vodno tijelo i može uzrokovati zagađenje. Procjena opterećenja ključna je za očuvanje i zaštitu nekog vodenog sustava. Opterećenje voda

podrazumijeva zahvaćanje voda, odnosno korištenje voda (javna vodoopskrba i gospodarski korisnici koji koriste vodu iz određenog vodnog tijela temeljem ugovora o koncesiji ili vodopravne dozvole) i onečišćenje voda (Hrvatske vode, 2015a). Onečišćenje voda uglavnom dolazi iz točkastih i raspršenih izvora. Točkasti izvori predstavljaju lokalizirani utjecaj i obuhvaćaju komunalne ispuste stanovništva i onečišćenje kroz gospodarske djelatnosti, pri čemu su gospodarski subjekti priključeni na javnu odvodnju, pa s komunalnim ispustima industrijska otpadna voda završi u nekom vodnom tijelu ili imaju dozvolu direktnog ispusta u okoliš (Grizelj Šimić, 2016). Za razliku od točkastih izvora, precizno određivanje onečišćenja iz raspršenih izvora nije moguće. Naime, raspršeni izvori predstavljaju opterećenje na cijeli sliv neke rijeke i njihovi su najčešći izvori dio stanovništva koje nije priključeno na javnu odvodnju, otpadne vode iz stočarstva, korištenje mineralnih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja u poljoprivredi i nepropisno odlaganje otpada (Hrvatske vode, 2015a). Procjeđivanjem iz takvih izvora kroz tlo, zagađivala dospiju do obližnjih rijeka ili drugih vodnih tijela i predstavljaju veliki rizik za životne zajednice u njima, ali i za ljude koji tu vodu koriste.

### **1.1.2. Tipovi zagađivača**

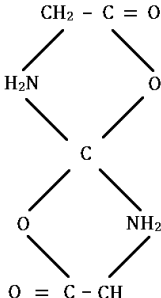
Tehnološki i industrijski razvitak, osim što su doprinijeli napretku i poboljšanju načina života ljudi, rezultirali su i izrazitim štetnim utjecajem na okoliš. Zagađenje tla, vode i zraka u urbanim sredinama je sveprisutno, a tipovi zagađivača su vrlo raznoliki. Anorganski zagađivači su primjerice toksični plinovi poput sumpornog dioksida ( $\text{SO}_2$ ), dušikovog dioksida ( $\text{NO}_2$ ) i sumporovodika ( $\text{H}_2\text{S}$ ), ali i različiti metali i spojevi metala (Walker, 2014). Za vodene ekosustave najveću opasnost prilikom unosa ovih zagađivala predstavljaju nedovoljno pročišćene industrijske otpadne vode. U anorgansko zagađenje voda spadaju i anorganski spojevi fosfora (P), dušika (N), klor (Cl) te drugi. U velikim koncentracijama hranjive soli P i N mogu uzrokovati eutrofikaciju, odnosno cvjetanje algi. Nakon što alge iskoriste hranjive soli, one ugibaju, a posljedična bakterijska razgradnja može dovesti do značajnog smanjenja kisika u vodi i ugibanja ostalih živih organizama (Walker, 2014). Spekter organskih zagađivača je puno širi i za mnoge se još ne može precizno procijeniti utjecaj na žive organizme u vodi, a posljedično i na ljude. Pesticidi, umjetna gnojiva, farmaceutici i deterdženti samo su neki od tih spojeva koji se danas nalaze u svim vodenim sustavima u blizini naseljenih područja. Ti organski spojevi ne utječu samo na boju, miris i okus vode, već mogu biti izrazito toksični i kancerogeni. U

vodenom mediju dolazi i do različitih kemijskih reakcija između organskih spojeva pa nastaju novi spojevi koji također mogu biti izrazito toksični (Štrkalj, 2014).

## 1.2. Metali

Metali imaju bitnu ulogu u funkcioniranju svih živih organizama i nalaze se prirodno u svim sastavnicama okoliša, no zbog porasta industrije i korištenja metala u proizvodnji došlo je do porasta koncentracija metala u okolišu unatrag nekoliko desetljeća. Neki se metali prirodno nalaze u većim koncentracijama u okolišu i živim organizmima, pa se ubrajaju u makroelemente poput magnezija (Mg), kalija (K), kalcija (Ca), natrija (Na), dok su koncentracije nekih metala u prirodi izrazito niske te se oni nazivaju metalima u tragovima, npr. bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn), selen (Se) (Riley i Chester, 1971). S ekološkog stajališta, osnovna karakteristika metala je njihova postojanost jer se ne mogu spontano trajno ukloniti iz okoliša u koji su dospjeli, već se nalaze u vodenom stupcu, kruže hranidbenom mrežom ili se talože u sedimentu (Cukrov i sur., 2008).

Metali se u vodenom okolišu mogu nalaziti u obliku metalnog iona, u sastavu neke anorganske ili organske molekule ili prisutni u živim organizmima (Slika 1). Nakon što metal uđe u okoliš, on može mijenjati kemijski oblik te tako postati više ili manje bioraspoloživ, a time i toksičan za živi svijet u vodi.

| Vrste metala                                                                                                                                                    | Promjer ( $\mu$ )               | Primjeri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Slobodni ioni otopljeni u vodi</p> <p>Složeni i ionski kompleksi</p> <p>Anorganski ionski parovi i kompleksi</p> <p>Organski kompleksi, kelati i spojevi</p> | 0,001                           | <p><math>Fe(H_2O)_6^{3+}; Cu(H_2O)_6^{2+}</math></p> <p><math>AsO_4^{3-}, UO_2^{2+}, Pb(CO_3)_2^{2-}</math></p> <p><math>CuOH^+, CuCO_3^0, Pb(CO_3)_2^{2-}</math></p> <p><math>AgSH^0, CuCl^+, Zn(OH)^-</math></p> <p><math>Me - OOCR^{N+}, HgR_2</math></p>             |
| <p>Metali vezani za organske materijale velikih molekulskih masa</p> <p>Visoko disperzirani koloidi</p> <p>Metali pridruženi koloidima</p>                      | <p>0,01</p> <p>↓</p> <p>0,1</p> | <p>Polimeri humičnih i fluvičnih kiselina s metalima <math>FeOOH</math>, <math>Mn(IV)</math> vodeni oksidi, <math>Me.aq^{n+}</math>, <math>Me_n(OH)_y</math>, <math>MeCO_3</math>, itd. na glini, <math>FeOOH</math>, organski <math>ZnSiO_3</math>, <math>CuCO_3</math>, <math>CdS</math> u <math>FeS</math>, <math>PbS</math></p> <p>Metali u algama</p> |
| <p>Precipitati, mineralne čestice, organske čestice</p> <p>Metali prisutni u živim i mrtvim organizmima</p>                                                     |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

**Slika 1** Oblici metala u vodi (preuzeto i prilagođeno prema Forstner i Wittmann, 1981)

Promjene mogućih specifičnih kemijskih oblika u kojima se neki metal može pojaviti u prirodi nazivamo specijacija (Forstner i Wittmann, 1981). Fizikalno-kemijski parametri vode poput temperature, pH vrijednosti, tvrdoće vode i otopljenog kisika ne utječu samo direktno na funkcioniranje živih organizama, već i na kemijski oblik u kojem se pojedini metal nalazi u okolišu, odnosno na specijaciju metala (Mason, 2002). Primjerice, pri nižim pH vrijednostima (kiseliji okoliš), više metala je prisutno u obliku hidratiziranog metalnog iona i kao takav je pristupačniji i toksičniji za biotu (Campbell i Stokes, 1985). Također, na primjeru kalifornijske pastreve, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) je dokazano da je toksičnost pojedinih metala (Cu, Zn, olovo (Pb), živa (Hg)) slabija u tvrdoj vodi, jer Ca ima veći afinitet za vezanje na membranu škrge riba, u odnosu na ostale katione u vodi, pa to smanjuje njihovu apsorpciju kroz škrge i posljedično akumulaciju u tkivu ribe (Mason, 2002).

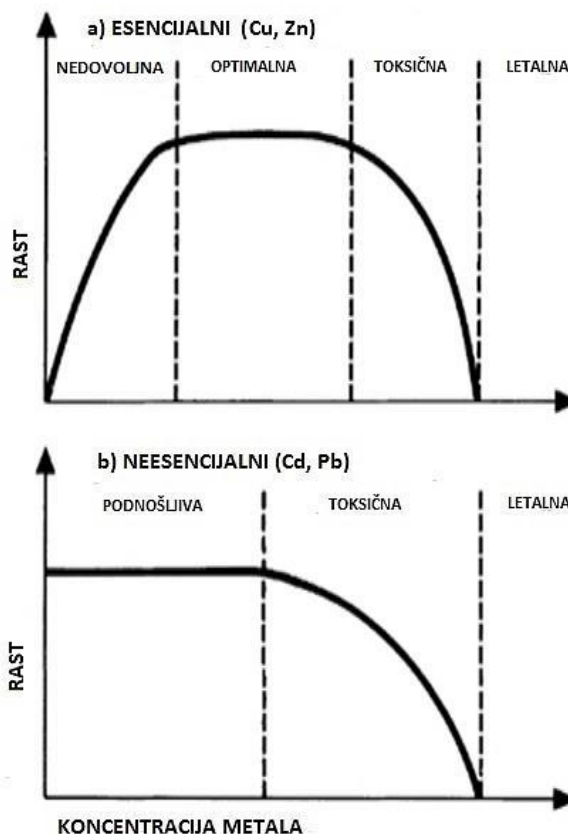
Utjecaj okolišnih faktora na metale u vodi i činjenica da je voda dinamični medij (posebno u rijekama) ukazuje da za procjenu utjecaja metala na biotu, nije bitna samo ukupna koncentracija nekog metala u vodi. Ta koncentracija zapravo odražava trenutnu vrijednost u trenutku uzorkovanja i ne daje informaciju o ukupnoj biološki raspoloživoj

koncentraciji tog metala (Florence i Batley, 1977). Da bi se dobro procijenilo onečišćenje metalima i utjecaj na žive organizme u vodi, a posljedično i na ljude putem prehrane, potrebno je istražiti dugoročnu izloženost biote biološki raspoloživim koncentracijama metala.

### **1.2.1. Esencijalni i neesencijalni metali i toksičnost**

Metale, kao i sve kemijske elemente, možemo podijeliti na esencijalne i neesencijalne. Esencijalni metali su metali koje nalazimo u živim bićima, neizostavni su za funkcioniranje brojnih životnih procesa, a nalaze se u sastavu molekula koje grade stanice i tkiva te njihov manjak u organizmu može uzrokovati brojne štetne učinke ili u konačnici smrt. Osim makroelemenata poput Mg, K, Na i Ca, neki metali u tragovima su također esencijalni, poput Cu, Zn, kobalta (Co), željeza (Fe), mangana (Mn), molibdena (Mo), kroma (Cr) (Wood i sur., 2012). Bez esencijalnih metala, normalan rast i razvitak organizma nije moguć. S druge strane, kao i sve elemente u tijelu, i metale organizmi trebaju u optimalnoj koncentraciji, što znači da izvan tog koncentracijskog raspona i esencijalni metali mogu biti toksični.

Neesencijalni metali su metali koji se nalaze u prirodi, a nisu nužni za izgradnju ili funkcioniranje živih organizama. Svi neesencijalni metali mogu se nalaziti u organizmima u uskom koncentracijskom rasponu koje organizam podnosi, a sve što prelazi te koncentracije rezultira toksičnim učinkom (Slika 2). Toksičnost neesencijalnih metala ovisi o njihovoj kemijskoj sličnosti s određenim esencijalnim metalima, jer zbog njihove sličnosti neesencijalni metali mogu zamijeniti esencijalne te istim putevima ući u organizam i vezati se za biološki važne molekule, što uzrokuje toksičnost. Neesencijalni metali su Cd, Pb, Hg, arsen (As), srebro (Ag) i drugi (Wood i sur., 2012).



**Slika 2** Utjecaj različitih koncentracijskih raspona esencijalnih i neesencijalnih metala na organizme (preuzeto i prilagođeno prema Baccini i Roberts, 1976 iz Forstner i Wittmann, 1981)

### 1.2.2. Bioakumulacija metala

Bioakumulacija je nakupljanje neke tvari iz okoliša u tkivima živih organizama. Uglavnom podrazumijeva nakupljanje štetnih tvari i odražava se na kruženje tih tvari hranidbenim lancima u nekom ekosustavu. Svi zagađivači u vodi na neki način uđu u hranidbenu mrežu, odnosno u žive organizme, a za njihovo izbacivanje iz organizma postoje specifični procesi i mehanizmi. Neki se iz organizma izbacuju direktnim izlučivanjem, a neki prolaze proces biotransformacije. Biotransformacija podrazumijeva biološki proces pretvorbe u kome tvari mijenjaju svoj oblik i svojstva, najčešće lipofilne tvari postaju hidrofilnije i tako podložnije izbacivanju iz organizma, no može doći i do promjene kojom se neka štetna tvar reaktivira i tek tad postane opasna za organizam (Sofilić, 2014). Ipak, postoje zagađivači, poput metala, koji se akumuliraju u specifičnim organima i tkivima. Kod riba akumulacija u tkivima ovisi o afinitetu nekog metala prema određenom tkivu, a poznato je da se većina metala najviše akumulira u jetri, bubrezima i škrgama (Jezierska, 2006).

### 1.2.3. Biološki učinci metala

Metali se u organizam vodenih životinja unose putem probavila, škrge te cijele površine organizma (Deb i Fukushima, 1999). U jednostavnijih vodenih organizama unos metala kroz cijeli epitel tijela ima veću važnost. U složenijih organizama pri vrhu hranidbenog lanca veću važnost ima unos putem škrge i probavila. Voda prolazi kroz škrge i tu se odvija izmjena plinova, odnosno disanje, no s vodom kroz škrge prolaze i sve ostale otopljene tvari, pa i metali. Upravo u tom ionskom obliku metali ulaze (pasivno ili aktivno) kroz membranu u stanice škrge. Direktan put unosa metala u organizam predstavlja hrana, odnosno unos putem probavila, koji je vrlo značajan za ribe (Kraal i sur., 1995 u Liang i sur., 1999, Filipović Marijić i sur., 2007).

Većina metala je najtoksičnija u svom najstabilnijem ionskom obliku (Duruibe i sur., 2007). Tada se mogu vezati za funkcionalno vrlo važne molekule u stanici, poput enzima i drugih proteina te tvoriti vrlo stabilne spojeve koji posljedično mogu biti inhibitori određenih procesa ili mogu poticati aktivnost ili sintezu određenih molekula (Bainy i sur., 2006). Izuzetak su Hg, As, Pb koji su toksičniji kao organometalni spojevi, koji su izrazito lipofilni te se zato vrlo lako unose u organizam. Organometalni spojevi se mogu direktno unositi u okoliš putem onečišćenja ili mogu nastati u vodi, sedimentu ili u živim organizmima procesom metilacije anorganskih metala koju provode različiti organizmi (Crompton, 2007). Čak i pri izrazito niskim koncentracijama organometalnih spojeva u vodenom okolišu, primjerice spojeva žive, dolazi do značajne inhibicije fotosinteze fitoplanktona, što posljedično šteti cijeloj živoj zajednici nekog vodenog sustava (Paulus, 1993). U istraživanju utjecaja organometalnog spoja metoksietil živinog klorida provedenom na vrsti ribe *Channa punctatus* (Bloch, 1793), nakon višemjesečnog izlaganja detektirane su značajne abnormalnosti jetre poput nekroza i hiperplazije, koje su uzrokovala razvitak tumora i u konačnici smrt jedinke (Crompton, 2007).

### 1.3. RIBE kao bioindikatorski organizam

Bioindikatori su organizmi koji svojom prisutnošću ili specifičnom reakcijom na određene čimbenike u okolišu mogu odražavati stanje okoliša. Prema Uredbi o standardu kakvoće voda ribe se koriste za ocjenjivanje ekološkog stanja tekućica, a u obzir se uzimaju prisutne vrste, zastupljenost pojedinih vrsta i starosna struktura populacije (Hrvatske vode, 2015b). Bioindikatorske vrste osim ekološkog stanja nekog vodenog



sustava, mogu biti i dobar pokazatelj antropološkog utjecaja. Ribe su dobar bioindikator stanja vodenog okoliša jer su u direktnom kontaktu sa zagađivačima u vodi, na vrhu su hranidbenog lanca, dovoljno su velike i zastupljene na pojedinom području, lako ih je determinirati, dovoljno su osjetljive na onečišćenje (de Andrade i sur., 2004).

Ribe su važna karika u svim hranidbenim mrežama vodenih ekosustava, gdje su u ulozi potrošača ili predatora. Kao predatori, kontroliraju biomasu nižih trofičkih razina, no s tom ulogom dolazi i do bioakumulacije različitih organskih i anorganskih onečišćivača. Metali se mogu taložiti u različitim dijelovima organizma riba, ovisno o kojem se metalu radi. Primjerice, Pb se taloži u koži, škragama, bubregu, jetri i kostima, Cd ima najveći afinitet za taloženje u jetri i bubrezima, Zn u jetri (Filipović Marijić i sur., 2006), dok se Hg akumulira u mišiću i jedan je od rijetkih metala koji se biomagnificira u hranidbenom lancu te može biti toksičan i za ljude putem prehrane.

#### **1.4. Ribe u prehrani ljudi**

Ribe su bitna i vrijedna namirnica u prehrani ljudi zbog bogatstva mineralima, vitaminima i esencijalnim masnim kiselinama. Ipak, ribe mogu imati i štetan učinak na zdravlje ljudi putem konzumacije riba koje su obitavale u onečišćenom okolišu (Alibabić, 2006). Neki od simptoma akutnog trovanja metalima su gastroenteralne poteškoće (mučnina, povraćanje), srčani problemi (aritmija, sniženje tlaka), poteškoće u radu središnjeg živčanog sustava (grčevi, koma, smrt), hemolitička anemija, plućni edemi i drugi (Anke, 2004). Osim akutnog trovanja, dugotrajna izloženost metalima također uzrokuje bolesti i poteškoće u ljudskom organizmu. Primjerice, poznato je da metali mogu imati kancerogeni učinak (Jarup, 2003). Smatra se da je mutagena aktivnost metala mala, no njihov utjecaj kao modifikatora ekspresije gena, odnosno epigenetskih modifikatora se sve više spominje i istražuje (Chervona i sur., 2012). Također, postoji povezanost povećane izloženosti nekim metalima sa znatnim povećanjem mogućnosti razvitka kardiovaskularnih bolesti, oštećenja bubrega, bolesti kostiju i drugih (Jarup, 2003). Najpoznatiji primjer bolesti uzrokovane konzumacijom ribe kontaminirane metalom, konkretno Hg, je Minamata bolest koja je zabilježena sredinom prošlog stoljeća u Japanu i od te je bolesti oboljelo i umrlo više tisuća ljudi (Harada, 1995). Tada je ustanovljeno da morski organizmi metiliraju Hg koja je puno toksičnija od anorganske žive (od 50-100 puta), a s obzirom da je lipofilna, lako se unosi u organizme. Japanci u svojoj prehrani jedu puno ribe i morskih plodova te je posljedično došlo do masovnog trovanja.

Općenito, najviše akutnih trovanja metalima događa se zbog konzumacije kontaminirane morske ribe i drugih morskih životinja, čija je zastupljenost u prehrani viša u odnosu na slatkovodne. No usprkos tome, u kontinentalnim krajevima su slatkovodne ribe ipak značajnije zastupljene u prehrani te je potrebno istraživati i izloženost slatkovodnih riba metalima, što zbog procjene zagađenja slatkovodnih ekosustava, što zbog eventualne opasnosti trovanja ljudi putem hrane. Jedna od prikladnih vrsta za istraživanje je potočna pastrva jer je dovoljno osjetljiva na okolišne promjene, a i često korištena riba u ljudskoj prehrani.

#### 1.4.1. Potočna pastrva

Potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) pripada porodici Salmonidae i autohtona je vrsta u Hrvatskoj (Slika 3). Inače je široko rasprostranjena u Europi, a umjetno je unesena u različite dijelove svijeta. Razlozi široke geografske rasprostranjenosti potočne pastrve su njezina izražena sposobnost adaptacije na novi okoliš, koloniziranja novih vodenih tokova, a poznata je i kao kvalitetna namirnica te je popularna za sportski ribolov (Klemetsen i sur., 2003). Potočna pastrva uglavnom obitava u gornjim i srednjim dijelovima rijeka i preferira hladnije i brze vodotoke. Karakterizira je vretenasto i izduženo tijelo. Iako joj je obojenje varijabilno, uglavnom su leđa tamnozelene boje, a trbuh bijele. Za ovu su vrstu specifične crne mrlje na leđima, a crvene mrlje na bokovima (Mrakovčić i sur., 2006). Potočna pastrva je predator koji se hrani manjim ribama i žabama, školjkašima, ličinkama kukaca i kukcima koji lete iznad površine vode te se tako nalazi na vrhu hranidbenih lanaca u vodenim ekosustavima gdje živi.



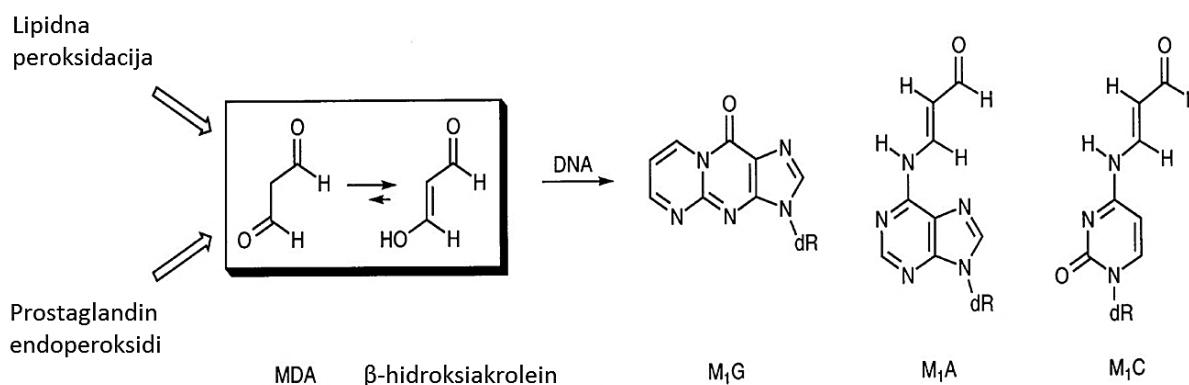
**Slika 3** Potočna pastrva (foto: P. Mustafić, preuzeto iz Mrakovčić i sur., 2006)

Prema Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske potočna pastrva se ubraja u osjetljive vrste. Najviše je ugrožena zbog onečišćenja i mehaničkih promjena obala i korita rijeka (kanaliziranje, betoniranje, izgradnja hidroelektrana) čime se može spriječiti migracija prema izvorišnim dijelovima, nužna za mrijest (Mrakovčić i sur., 2006).

## 1.5. Biomarkeri izloženosti riba metalima

### 1.5.1. Biomarker oksidativnog stresa – malondialdehid

Oksidativni stres je stanje uzrokovano različitim čimbenicima, a karakterizira ga nemogućnost kontrole stvaranja kisikovih i drugih radikala, koji dovode do stvaranja još štetnijih molekula i trajnih oštećenja stanica, membrana i bitnih molekula poput DNA. Kao posljedica oksidativnog stresa u stanici ili organizmu javlja se i lipidna peroksidacija kojom se razgrađuju višestruko nezasićene masne kiseline na membrani, a među krajnjim produktima lipidne peroksidacije najzastupljeniji je malondialdehid (MDA) (Pampanin i sur., 2005). MDA se nakon stvaranja može enzimatski metabolizirati ili reagirati sa staničnim proteinima i DNA što rezultira oštećenjima tih molekula. Konkretno, MDA reagira s  $\text{NH}_2$  skupinom na molekuli pri čemu nastaju kompleksi MDA i nukleinskih baza (Slika 4), od kojih najveći afinitet ima prema bazi gvaninu (Esterbauer i sur., 1991).



**Slika 4** Sinteza MDA i nastanak kompleksa MDA i nukleinskih baza gvanin, adenin i citozin (preuzeto i prilagođeno iz Marnett, 2000)

MDA je produkt lipidne peroksidacije koji je najviše istraživao te je uz njegovu genotoksičnost dokazano da je i vrlo dobar pokazatelj onečišćenja okoliša te se u velikoj mjeri upravo koristi u istraživanjima procjene stanja vodenog okoliša kao biomarker oksidativnog stresa uzrokovanog onečišćenjem (Farombi i sur., 2007a).

### **1.5.2. Biomarker izloženosti organofosfatima i pojedinim metalima – acetilkolinesteraza**

Acetilkolinesteraza (AChE) je jedan od biomarkera koji se često koristi u istraživanjima u ekotoksikologiji, jer je dobar indikator neurotoksičnosti. AChE se u organizmu može nalaziti u nekoliko različitih molekulskih oblika i u različitim tkivima i stanicama; primjerice mišićima i živcima, središnjim i perifernim tkivima, motornim i senzorskim vlaknima, na membrani eritrocita (Čolović i sur., 2013). Najveća aktivnost AChE odvija se u sinaptičkom prostoru neuromuskularne veze, a glavna uloga ovog enzima je razgradnja neurotransmitera acetilkolina na acetat i kolin, kako bi se prekinuo prijenos impulsa (Bainy i sur., 2006). AChE je serinska hidrolaza s iznimnom specifičnom katalitičkom aktivnošću. Procijenjeno je da molekula AChE može degradirati do 25000 molekula acetilkolina u sekundi (Quinn, 1987, Taylor i Radić, 1994 u Čolović i sur., 2013). Inhibicija AChE dovodi do neprestanog prijenosa podražaja (hiperstimulacije) i u konačnici do tremora i paralize mišića (Burgeot i sur., 2010). Različite tvari mogu biti inhibitori AChE i način inhibicije nije uvijek isti. Inhibitori poput organofosfata djeluju tako da se acetilkolin nakuplja u sinaptičkoj pukotini te se vrlo često koriste kao insekticidi, a neki se inhibitori AChE čak koriste u farmakoterapiji različitih neuroloških bolesti i poremećaja poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (Čolović i sur., 2013).

AChE je uglavnom proučavana kao biomarker izloženosti organofosfatima, no u novije vrijeme postoje sve veće indikacije da i drugi spojevi i zagađivači u okolišu, poput ugljikovodika, deterdženata i metala, mogu uzrokovati promjene u aktivnosti AChE (Romeo i Giamberini, 2013). U brojnim je istraživanjima potvrđen utjecaj metala na inhibiciju aktivnosti AChE, no točan mehanizam inhibicije još nije otkriven (Kopecka-Pilarczyk, 2010).

### **1.6. Ciljevi istraživanja**

Glavni cilj ovog rada je procjena utjecaja otpadnih voda tvornice vijaka i komunalnog ispusta grada Knina, koji se bez adekvatnog pročišćavanja ulijevaju u rijeku Krku, na standard stanovništva, opskrbu pitkom vodom te sigurnost korištenja potočne pastrve iz rijeke Krke u prehrani ljudi.

Specifični ciljevi istraživanja:

- procijeniti utjecaj zagađivala na potočnu pastrvu (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke praćenjem biomarkera oksidativnog stresa (indukcija MDA u jetri) te biomarkera izloženosti organofosfatima i metalima (inhibicija aktivnosti AChE u mišiću)
- odrediti koncentraciju 16 ukupno otopljenih metala u vodi čime se dobio uvid u izloženost riba metalima iz okoliša
- izmjeriti koncentracije metala u mišiću potočne pastrve, pomoću kojih se procijenjuje sigurnost konzumacije pastrve u ljudskoj prehrani
- usporediti dobivene rezultate na postaji pod direktnim utjecajem onečišćenja (dio toka rijeke Krke uz grad Knin), s podacima s referentne postaje (izvor rijeke Krke) čime se procijenjuje jesu li antropogeni utjecaji uzrokovali značajne promjene u koncentracijama ukupno otopljenih metala u vodi i ribama te biološkim pokazateljima potočne pastrve (MDA i AChE)
- istražiti postoji li sezonska varijabilnost svih navedenih čimbenika, njihovom usporedbom u jesenskom i proljetnom periodu.

## 2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno na rijeci Krki gdje su na odabranim lokacijama uzorkovane potočne pastrve i voda. Lokacije su odabrane kako bi se jasno vidjela razlika kakvoće vode na području pod antropogenim utjecajem, odnosno uz ispušt komunalnih i otpadnih industrijskih voda kod grada Knina te na području bez očekivanog antropogenog utjecaja, izvoru rijeke Krke.

Rijeka Krka je rijeka Jadranskog slijeva koja izvire u podnožju Dinare podno Topoljskog slapa, 3,5 km udaljeno od grada Knina, a u Jadran se ulijeva kod Šibenika (Javna ustanova NP Krka, 2017). Zbog prirodnih ljepota, slapova, brzaca i podzemnih izvora veći dio rijeke Krke je zaštićen i 1985. proglašen Nacionalnim parkom (Mrakovčić i sur., 2006). Posebnu važnost Krke svakako predstavljaju sedrene barijere koje stvaraju specifična staništa za vodene organizme. Zbog sedrenih barijera i zbog sveobuhvatne raznovrsnosti staništa u i oko rijeke Krke došlo je do razvoja velikog broja biljnih i životinjskih vrsta, od kojih su brojne ugrožene, rijetke i endemične te zbog toga izrazito važne (Javna ustanova NP Krka, 2017). Prema Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske, od 23 vrste riba koje žive u rijeci Krki, čak njih polovica su endemi (Vuković i Ivanović, 1971, Mrakovčić i Mišetić, 1990).



**Slika 5** Položaj grada Knina, tvornice vijaka, rijeke Krke i njezine pritoke rijeke Orašnice (satelitski prikaz preuzet s <https://maps.google.hr/>)



## 2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Kao i svi vodeni sustavi koji se nalaze u blizini naseljenih mjesta, rijeka Krka je pod velikim antropogenim utjecajem (Slika 5). Grad Knin koji se nalazi na rijeci Krki, predstavlja najveću opasnost za onečišćenje Krke jer tu postoje točkasti izvori onečišćenja. Iz ispusta komunalnih otpadnih voda grada Knina komunalne vode se bez adekvatnog pročišćavanja direktno izljevaju u rijeku Krku (Slika 6).



**Slika 6** Ispust komunalnih otpadnih voda grada Knina u rijeku Krku (foto: Vlatka Filipović Marijić)



**Slika 7** Bazeni industrijske otpadne vode tvornice vijaka DIV d.o.o., tzv. "kninska crna jama" (foto: Vlatka Filipović Marijić)

Također, otpadne vode iz proizvodnje tvornice vijaka u Kninu se ispuštaju u bazene predviđene za pročišćavanje i odlaganje otpadnih voda i mazuta od te iste tvornice, međutim bazeni se nisu čistili i održavali te više nemaju svoju svrhu (Slika 7). Sve je smješteno u blizini obale rijeke Orašnice, neposredno prije njezinog ušća u rijeku Krku, a odvojeno je šljunčanim nasipom od riječnog korita. U vrijeme obilnijih oborina otpadne vode su se zbog poplava ulijevale u rijeku Orašnicu, a zatim i u rijeku Krku te su nedavno Hrvatske vode podigle visinu nasipa, međutim zbog krškog terena ove otpadne vode dopijevaju i u podzemne vodotoke te ugrožavaju opskrbu stanovništva pitkom vodom. Upravo su ovi bazeni u Nacrtu prijedloga plana gospodarenja otpadom Republike Hrvatske za razdoblje 2016.-2022. godine prikazani kao jedna od "crnih točaka" onečišćenja. Sve to predstavlja ozbiljan antropogeni utjecaj na rijeku Krku i ugrožava kakvoću vode i bioraznolikost živog svijeta samo 2 km uzvodno od granice Nacionalnog parka Krka.

### 3. MATERIJALI I METODE

Terenski dio ovog rada proveden je na rijeci Krki, dok je laboratorijski dio rada izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

#### 3.1. Prikupljanje uzoraka

Prikupljanje uzoraka provedeno je sezonski tijekom listopada 2015. i svibnja 2016. na dvije postaje, referentnoj (izvor rijeke Krke: 20.10.2015. i 6.5.2015.) i na postaji pod antropogenim utjecajem (dio toka rijeke Krke uz grad Knin, nizvodno od ulijevanja industrijskih i komunalnih otpadnih voda: 21.10.2015. i 5.5.2016.).

##### 3.1.1. Uzorkovanje jedinki riba

Uzorkovanje riba provedeno je elektro-agregatom prema normi HRN EN 14011 (2005), metodom odobrenom od Uprave ribarstva Ministarstva poljoprivrede (525-13/0545-15-2). Kao predstavnik ihtiofaune rijeke Krke, uzorkovana je potočna pastrva (*S. trutta*), čije su jedinke dopremljene žive u plastičnim posudama s aeriranom riječnom vodom do laboratorija u Kninu, gdje je provedeno usmrćivanje riba i izolacija mišića i jetre. Riba su usmrćene primjenom anestetika MS-222 (Sigma, SAD), a usmrćivanje i izolaciju tkiva riba proveli su članovi Laboratorija za biološke učinke metala, koji su registrirani kod Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede kao korisnici za usmrćivanje riba te rad na izoliranim organima, tkivima i trupovima životinja koje su usmrćene u tu svrhu (HR-POK-025). Izolirano tkivo mišića i jetre pohranjeno je u tekući dušik na -195,8 °C i tako prevezeno do Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, gdje je prebačeno na -80 °C do daljnje obrade.

##### 3.1.2. Određivanje biometrijskih pokazatelja riba

U obje sezone su svakoj jedinki potočne pastrve određeni osnovni biometrijski pokazatelji:

- ukupna dužina ribe – od početka glave do kraja repne peraje (cm)
- ukupna masa ribe (g) te masa jetre i gonada (g)
- spol – određen je vizualno, a po potrebi pregledom nativnih preparata gonada svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 100x



Uz navedene biometrijske pokazatelje su izračunati:

- Hepatosomatski indeks (%):  $(\text{masa jetre (g)}/\text{ukupna masa (g)}) \times 100$
- Gonadosomatski indeks (%):  $(\text{masa gonada (g)}/\text{ukupna masa (g)}) \times 100$
- Fultonov kondicijski indeks:  $(\text{ukupna masa (g)}/\text{ukupna dužina (cm}^3)) \times 100$

#### 3.1.3. Prikupljanje uzoraka vode

Osim jedinki potočne pastrve, na istim postajama su u triplikatu prikupljeni i uzorci vode, koji su u proljetnom periodu dodatno uzorkovani i u bazenima s otpadnom industrijskom vodom iz tvornice vijaka. Uzorci vode su pohranjeni u plastične polietilenske boce (25 mL), prethodno isprane dušičnom kiselinom (v/v 10 %, p. a., Kemika, Hrvatska) te Mili-Q vodom. Dio vode je korišten za određivanje fizikalno-kemijskih čimbenika, a dio za određivanje koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi. Boce s vodom su pohranjene u plastične vrećice kako bi se izbjeglo dodatno onečišćenje, a cijeli postupak je proveden uz korištenje gumenih rukavica bez pudera.

#### 3.2. Određivanje fizikalno-kemijskih čimbenika vode

Na terenu je neposredno (*in situ*) na izvoru rijeke Krke te u dijelu toka uz grad Knin u obje sezone te dodatno u proljetnom periodu u bazenima otpadnih voda tvornice vijaka, sandom SevenGo (Mettler Toledo) izvršeno određivanje sljedećih fizikalno-kemijskih čimbenika vode: temperature, električne vodljivosti, ukupno otopljenih soli (TDS, eng. total dissolved solids), pH, količine otopljenog kisika i zasićenje kisikom. Određivanje preostalih fizikalno-kemijskih čimbenika vode (koncentracije iona hranjivih soli (nitrita, nitrata, ortofosfata) i kemijska potrošnja kisika (KPK)) provedeno je u laboratoriju unutar 24 sata po uzimanju uzoraka, koji su do tog trenutka bili pohranjeni na 4 °C. KPK je određena prema standardnoj metodi HRN EN ISO 8467:2001. Ortofosfati su određeni metodom s askorbinskom kiselinom pomoću UV/VIS spektrofotometra (HACH DR 6000, SAD). Količina nitrita određena je metodom diazotiranja, a količina nitrata metodom redukcije Cd prema postupku iz uputa Methods for the Examination of Water & Wastewater (2012).

#### 3.3. Priprema tkiva za mjerenje metala i biomarkera

Koncentracije metala su izmjerene u razgrađenom mišiću u svrhu određivanja ukupne količine metala u jestivom tkivu i procjene rizika konzumacije ovih riba u ljudskoj

prehrani. Mišić je razgrađen u sušioniku u otopini vodikovog peroksida i dušične kiseline. Od svake je jedinke odvagano oko 0,1 g mišićnog tkiva u duplikatu direktno u epruvetu za razgradnju, a zatim u digestoru dodano 4 ml dušične kiseline ( $\text{HNO}_3$ , *Suprapur*) i 2 ml vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , *Suprapur*) (Slika 8). Nakon što je svaka epruveta omotana teflonskom trakicom da se spriječi gubitak isparavanjem, uzorci su pohranjeni u sušionik 3,5 sata na 85 °C te nakon razgradnje do bistre otopine ostavljeni da se ohlade. U svaki uzorak je dodan indij (In), u volumenu da u konačnoj otopini koncentracija In bude  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  te su svi uzorci dodatno razrijeđeni s Milli-Q vodom 5 puta za mjerenje mikroelemenata, odnosno 20 puta za mjerenje makroelemenata.



**Slika 8** Priprema uzoraka mišićnog tkiva potočne pastrve za razgrađivanje u sušioniku

U svrhu određivanja biomarkera, jetra i mišić potočne pastrve su homogenizirani pomoću homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Evenhjem GLAS-COL, SAD) pri 6000 okretaja u minuti. Homogenizacija je postupak kojim se mehaničkom silom istiskuje stanična tekućina iz tkiva, a cijeli se postupak provodi držeći sav pribor, kemikalije i uzorke na ledu kako bi se spriječila razgradnja proteina. Uzorci jetre su izvagani u epruvetama za homogenizaciju u koje je zatim dodan 100 mM TrisHCl/Base pufer, pH = 8,5 (Sigma, SAD) rashlađen na 4 °C u količini da se dobije razrjeđenje 6 puta. U pufer su dodani inhibitori proteolitičke aktivnosti (0,5 mM fenil-metilsulfonil-fluorid (PMSF, Sigma, SAD), otopljen u etanolu) i 0,006 mM leupeptin (LEU, Sigma, SAD), otopljen u 20 mM Tris-HCl) te reduzens koji sprječava oksidacije proteina na zraku (1 mM ditiotritol (DTT, Sigma SAD)). Nakon homogenizacije dobiveni su homogenati prebačeni u epruvete za centrifugiranje te su uzorci centrifugirani u Avanti J-E centrifugi (Beckman Coulter, SAD) 10 minuta na 3000xg na 4 °C. Dobiveni

supernatant je odvojen u duplikatu po 250  $\mu\text{L}$  te pohranjen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do mjerenja biomarkera MDA.

Za određivanje aktivnosti biomarkera AChE i koncentracije ukupnih proteina u postmitohondrijskoj frakciji (PMF) mišića, tkivo je homogenizirano u istom puferu i na isti način kao i za određivanje MDA, ali je uzorke bilo potrebno centrifugirati 30 minuta na  $9000\times g$  na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja supernatant je odvojen za mjerenje aktivnosti AChE te koncentracija ukupnih proteina u PMF mišića, za svaki pokazatelj u triplikatu po 40  $\mu\text{L}$  te pohranjen u zamrzivač na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4. Mjerenje koncentracija metala u vodi i mišiću pastrve

Koncentracije metala u vodi i mišiću pastrve mjerene su metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) (Slika 9). U ovoj metodi spregnuta plazma služi kao ionizacijski izvor, dok se detekcija metala vrši masenom spektrometrijom, a samo uvođenje uzoraka u ICP-MS vrši se uporabom Autosamplera ASX 510 (CETAC, SAD). U vodi i u mišiću potočne pastrve određene su koncentracije 16 metala: 12 mikroelemenata (Se, Rb, Cd, Cs, Tl, Pb, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, As) i 4 makroelementa (Na, K, Ca, Mg).

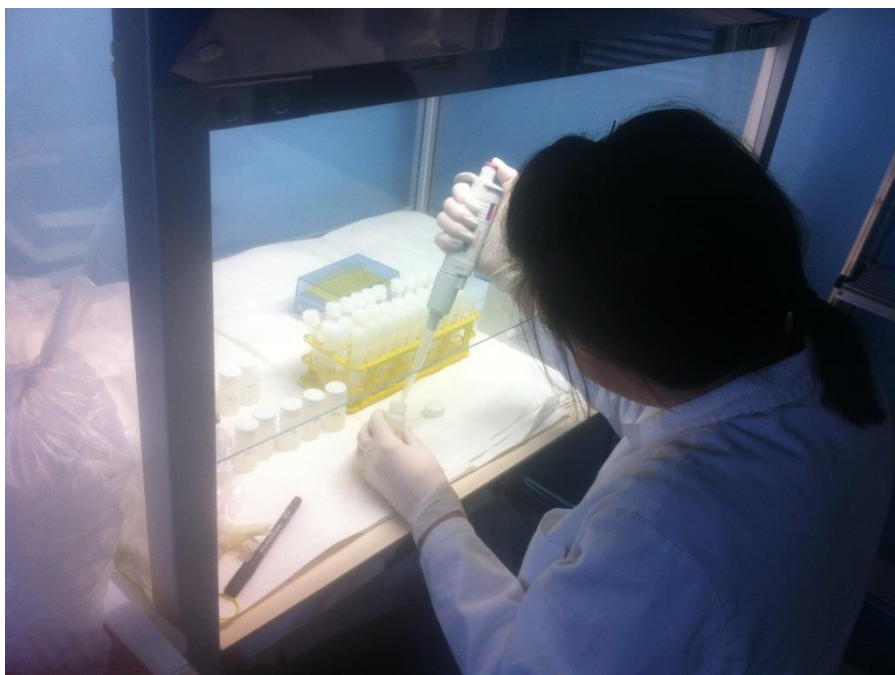
Uzorci vode su odmah na terenu profiltrirani kroz filtere promjera pora  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  (Sartorius, Njemačka) te zakiseljeni dušičnom kiselinom (v/v 1 %; Suprapur, Merck, Njemačka). Do daljnje obrade u laboratoriju su profiltrirani uzorci vode pohranjeni na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  u polietilenske plastične boce koje su prethodno isprane s dušičnom kiselinom i Milli-Q vodom. U sve uzorke vode, kao i u kalibracijski standard i slijepu probu je prije mjerenja metala dodan interni standard In ( $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , Fluka, Njemačka). Slijepa proba ima svrhu detekcije eventualnih pogrešaka u analizi i ona sadrži samo interni standard In i dušičnu kiselinu. Eksterna kalibracija provedena je pripremom odgovarajućih standardnih otopina u 5 %  $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Njemačka) iz multielementnih standardnih otopina za metale u tragovima ( $100\text{ mg L}^{-1}$ , Analitika, Republika Češka) i za makroelemente (Ca  $2,0\text{ g L}^{-1}$ ; Mg  $0,4\text{ g L}^{-1}$ ; Na  $1,0\text{ g L}^{-1}$ ; K  $2,0\text{ g L}^{-1}$ ; Fluka, Njemačka).

Za mjerenje koncentracija makroelemenata, uzorci vode su prethodno razrijeđeni 10 puta Milli-Q vodom, dok su koncentracije mikroelemenata određene direktno iz nerazrijeđenih uzoraka.



**Slika 9** Maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) i Autosampler ASX 510

Metali u uzorcima mišića potočne pastrve koji su prethodno razgrađeni u sušioniku mjere se istom metodom kao metali u vodi, odnosno masenom spektrometrijom visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka). Duplikati razgrađenih uzoraka se prije mjerenja razrijede s Milli-Q vodom, 5 puta za mjerenje koncentracija mikroelemenata i Ca te je koncentracija kiseline u uzorcima za mjerenje oko 5 %, odnosno 20 puta za makroelemente Na, Mg i K te je koncentracija kiseline u uzorcima za mjerenje oko 1,2 %. U sve uzorke dodaje se i In kao interni standard u volumenu da koncentracija In u uzorcima za mjerenje bude  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Slika 10).

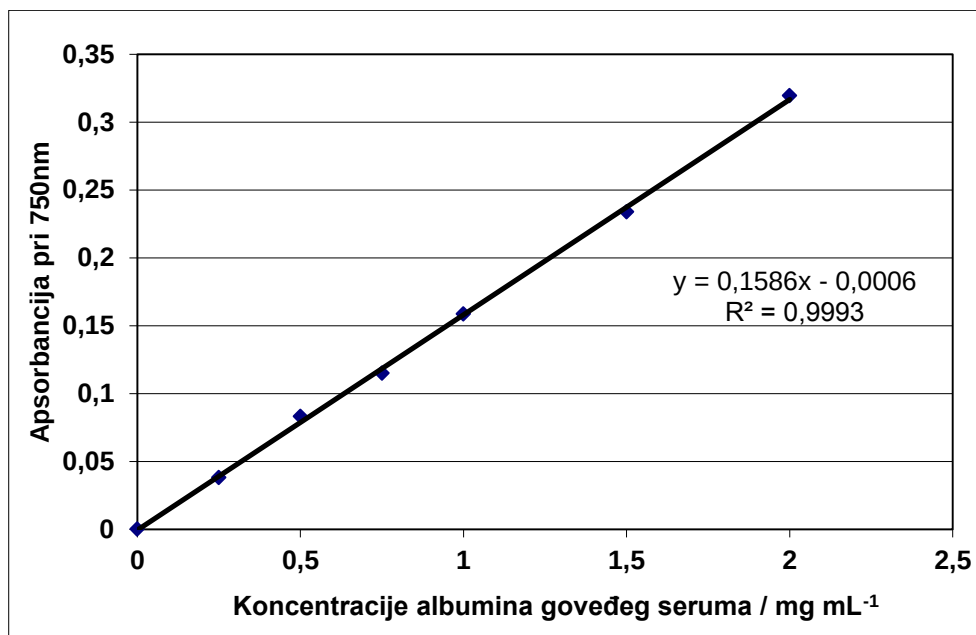


**Slika 10** Priprema uzoraka mišićnog tkiva potočne pastrve za mjerenje koncentracija metala na HR ICP-MS-u

### **3.5. Mjerenje koncentracija ukupnih proteina u postmitohondrijskoj frakciji mišića pastrve**

Ukupni proteini određuju se kalorimetrijskom metodom po Lowry-u (Lowry i sur., 1951), koja se temelji na dodatku reagensa bakrovog tartarata i Folinovog reagensa u uzorke PMF mišića pastrve. Dodatkom bakrovog tartarata odvija se reakcija u kojoj se  $\text{Cu}^{2+}$  ioni reduciraju u  $\text{Cu}^{+}$  te se vežu za proteine u kompleks  $\text{Cu}^{+}$ -protein. Folinov reagens zatim reagira s nastalim kompleksima  $\text{Cu}^{+}$ -protein pri čemu nastaje plavo obojenje, koje maksimalan intenzitet razvija nakon 15 minuta stajanja u mraku. Apsorbancija, koja je proporcionalna intenzitetu plavog obojenja, odnosno koncentraciji proteina, mjeri se fotometrom (Tecan Infinite M200, Švicarska) na 750 nm valne duljine, a proporcionalna je intenzitetu plavog obojenja. Prije mjerenja apsorbancije uzoraka, određen je kalibracijski pravac mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija otopine albumina goveđeg seruma (BSA). Priređen je koncentracijski raspon  $0,25\text{--}2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA razrjeđivanjem BSA s puferom za homogenizaciju koji prema uputama za određivanje ukupnih proteina ne utječe na vrijednosti apsorbancije (Bio-Rad DC Protein Assay). Za određivanje kalibracijskog pravca također se mjeri i apsorbancija pufera, odnosno slijepa proba, čija se vrijednost oduzima od vrijednosti apsorbancija različitih poznatih koncentracija otopina albumina

goveđeg seruma. Svi uzorci i otopine BSA pripremljeni su u triplikatima, a uzorke je bilo potrebno razrijediti 20x prije dodavanja reagensa i mjerenja apsorbancije kako bi bili u koncentracijskom rasponu kalibracijskog pravca. Mjerenje je provedeno u mikroploči s jažicama u koje se stavlja 5  $\mu$ l PMFa + 25  $\mu$ l reagensa bakrovog tartarata + 200  $\mu$ l Folinovog reagensa. Od vrijednosti apsorbancija uzoraka oduzeta je apsorbancija slijepe probe i očitana je koncentracija proteina prema dobivenom kalibracijskom pravcu (Slika 11).



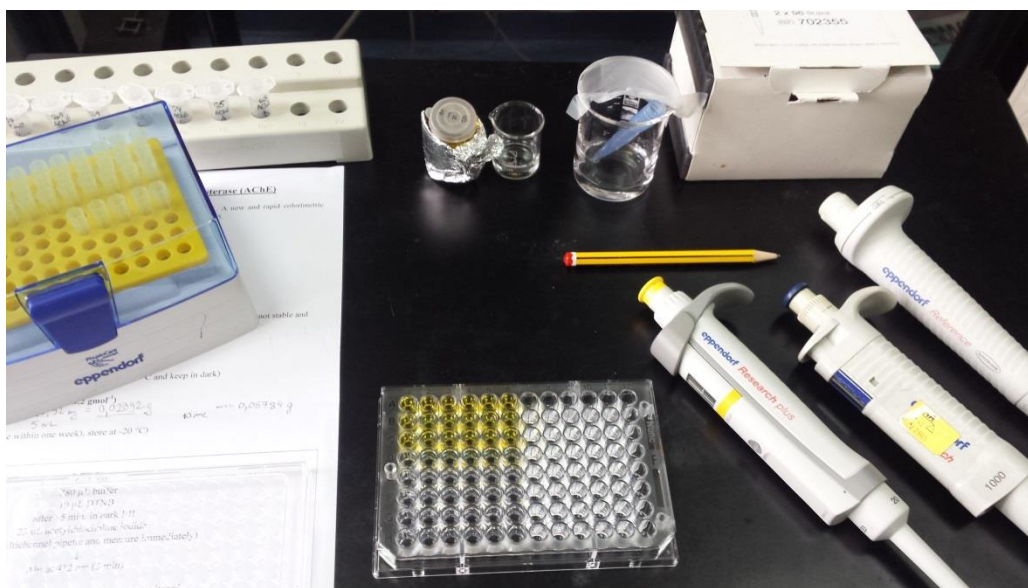
**Slika 11** Kalibracijski pravac dobiven mjerenjem apsorbancije slijepe probe i poznatih koncentracija otopine BSA pri 750 nm

### 3.5. Mjerenje biomarkera AChE u mišiću potočne pastrve

Analiza biomarkera AChE provodi se metodom po Ellmanu (Ellman i sur., 1961) mjerenjem apsorbancije na 412 nm uporabom fotometra (Tecan Infinite M200, Švicarska). Osnova metode je hidroliza acetilkolina od strane AChE pri čemu nastaju acetat i tiokolin te tada tiokolin reagira s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB) i nastaje 5-tio-2-tionitrobenzojev kiseli anion (TNB) koji daje žuto obojenje. Reakcija se provodi u mikroploči s jažicama u koje se nanosi 40  $\mu$ L uzorka PMF + 1,4 mL fosfatnog pufera + 25  $\mu$ l DTNB (Slika 12). U reakcijsku se smjesu nakon stajanja u mraku 15 minuta dodaje 35  $\mu$ l acetiltiokolin jodida i odmah se na fotometru mjeri apsorbancija tijekom 5 minuta (početna apsorbancija i zatim svaku minutu). Uz svaku seriju mjerenja uzoraka je dodan i uzorak pufera za homogenizaciju kao slijepa proba te je od apsorbancija uzoraka oduzeta



apsorbancija slijepe probe. Aktivnost enzima određena je prema formuli:  $\Delta n = V / (\epsilon \times l) \times \Delta A$ ; gdje je V volumen reakcijske smjese (240  $\mu\text{L}$ ),  $\epsilon$  je molarni koeficijent apsorbcije ( $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), l je udaljenost kroz koju prolazi svjetlost (visina uzorka, u ovim uvjetima 0,714 cm), a  $\Delta A$  je razlika između očitane početne i završne apsorbcije. Aktivnost AChE izražena je u jedinici: nmol po minuti i po miligramu proteina te je zbog toga bilo neophodno izmjeriti ukupne proteine u PMF frakciji.



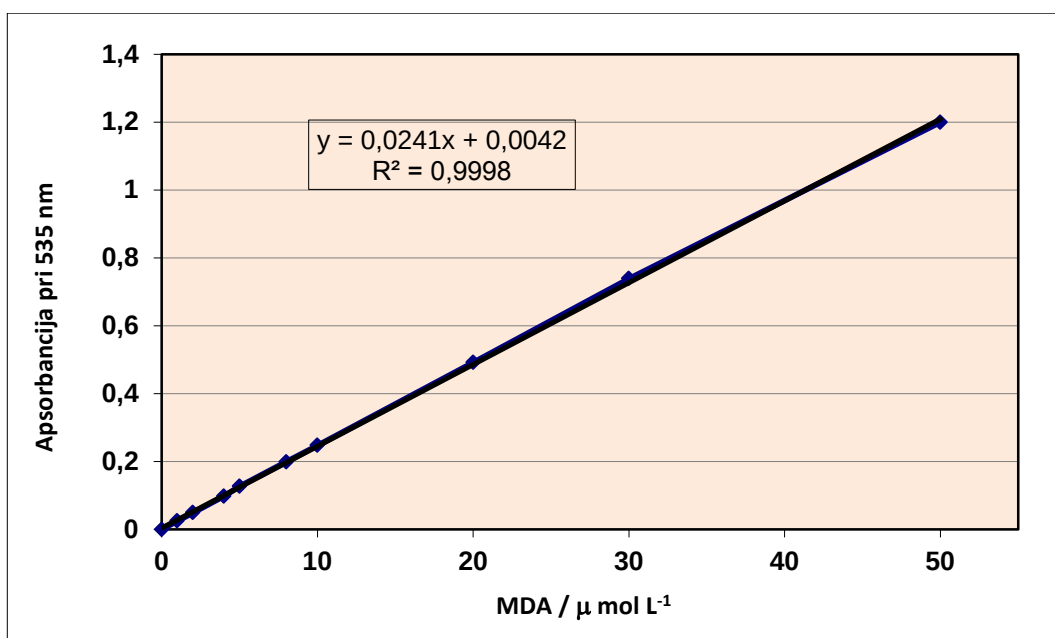
**Slika 12** Priprema reakcijske smjese za mjerenje aktivnosti AChE metodom po Ellmanu

### 3.6. Mjerenje biomarkera MDA u jetri potočne pastrve

Metoda mjerenja koncentracije MDA u staničnoj frakciji jetre temelji se na raspadu lipidnih peroksida tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti. Iako su primarni produkti lipidne peroksidacije hidroksiperoksidi, njih zbog reaktivne prirode i nestabilnosti nije moguće kvantitativno mjeriti, već se mjeri MDA, sekundarni produkt lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007). Mjerenje MDA provedeno je uporabom sljedećih kemikalija: 1 % butilirani hidroksitoluen (BHT, Sigma, SAD) otopljen u apsolutnom etanolu, tiobarbituratna kiselina (TBA, Sigma, SAD), 10% trikloroetenu kiselinu (TCA, Kemika, Hrvatska) i 3 mM MDA standard (1,1,3,3-tetraetoksi-propan, TEP, Sigma, SAD) otopljen u 1N HCl (Suprapur, Merck, Njemačka).

Postupak se provodi dodavanjem TCA i TBA u 250  $\mu\text{L}$  uzorka, nakon čega se uzorci ostave 15 minuta na 4 °C a zatim centrifugiraju 15 minuta na 4000xg, 4 °C. Nakon centrifugiranja se u dobiveni supernatant dodaje TBA i reakcijska smjesa se zagrijava u

grijaćem bloku 30 minuta na 100 °C. Nakon zagrijavanja, uzorci se hlade na ledu 15 minuta, a zatim se nanose u jažice mikroploče i očitava se apsorbancija na 535 nm na fotometru (Tecan Infinite M200, Švicarska). Za izradu kalibracijskog pravca priređene su otopine MDA standarda u puferu za homogeniziranje u koncentracijskom rasponu 1-50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Standardi i slijepa proba (pufer za homogeniziranje) tretiraju se na isti način kao i uzorci. Intenzitet nastalog obojenja odgovara koncentraciji MDA u uzorku, čija jedna molekula reagira s dvije molekule TBA te zagrijavanjem reakcijske smjese pri niskom pH dolazi do stvaranja MDA-TBA kompleksa (Bergamo i sur., 1998). MDA-TBA kompleks ružičaste je boje i apsorbira zračenje na 535 nm. Nakon mjerenja, apsorbancija slijepe probe oduzima se od apsorbancija standarda i uzoraka, a koncentracija MDA u uzorcima se očitava prema kalibracijskom pravcu (Slika 13) i izražava kao nmol po gramu mokre mase.



**Slika 13** Kalibracijski pravac dobiven mjerenjem apsorbancije slijepe probe i poznatih koncentracija MDA standarda pri 535 nm valne duljine

### 3.7. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je u računalnom programu SigmaPlot 11.0, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Provjera statističke značajnosti za podatke o koncentracijama metala u mišiću potočne pastrve i vodi rijeke Krke te biomarkera MDA i AChE po sezonama (listopad 2015. i svibanj 2016.), kao i između postaja (dio toka rijeke Krke uz grad Knin i referentna postaja – izvor rijeke Krke) provedena je uporabom t-testa. Zbog dodatne usporedbe s trećom postajom (otpadne



industrijske vode tvornice vijaka) tijekom svibnja 2016., statistička značajnost između postaja je za navedeni period testirana primjenom jednosmjerne analize varijance (One Way Anova) uz primjenu post-hoc Kruskal-Wallis testa. Razine značajnosti za pojedine parametre su istaknute direktno u tablicama ili na slikama.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Procjena kakvoće vode rijeke Krke

#### 4.1.1. Fizikalno kemijski čimbenici

Fizikalno-kemijski čimbenici izmjereni u uzorcima vode rijeke Krke na njezinom izvoru i kod grada Knina nizvodno od ulijevanja industrijskih i komunalnih otpadnih voda ukazuju na opće ekološko stanje vode rijeke Krke (Tablica 1). Osim u uzorcima vode iz rijeke Krke, tijekom svibnja 2016. su fizikalno-kemijski čimbenici određeni i u uzorcima industrijske otpadne vode obližnje tvornice vijaka. Od 10 izmjerenih fizikalno-kemijskih čimbenika u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) su granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja navedene za pH, KPK, nitrate i ortofosfate te su za njih u Tablici 1 istaknute vrijednosti koje su ispod graničnih vrijednosti za vodu vrlo dobrog, odnosno dobrog ekološkog stanja.

Temperaturne vrijednosti vode su u obje sezone niže na izvoru rijeke Krke u odnosu na vrijednosti kod Knina, dok je izmjerena temperatura u bazenu s industrijskom otpadnom vodom u svibnju 2016. bila najviša i iznosila je 19,1 °C. Temperaturni raspon u jesenskoj i proljetnoj sezoni na izvoru rijeke Krke je 9,6-10,5 °C dok je u dijelu toka uz grad Knin 11,3-11,5 °C (Tablica 1). Izmjerene pH vrijednosti uzoraka vode s postaje izvor kreću se u rasponu od 7,60 do 7,70, dok je kod Knina taj raspon neznatno viši, odnosno od 7,75 do 8,09. Vrijednost pH industrijske otpadne vode u svibnju 2016. je bila najniža, odnosno 7,31. Vrijednosti za električnu vodljivost i TDS su kroz obje sezone više na postaji kod Knina u odnosu na izvor rijeke Krke, dok su najviše vrijednosti izmjerene u uzorcima industrijskih otpadnih voda. Otopljeni kisik i zasićenje kisikom imaju usporedive vrijednosti na obje postaje na rijeci Krki, s izuzetkom postaje kod Knina u listopadu 2015. kada su oba parametra niža u odnosu na izvor. U industrijskoj otpadnoj vodi obje izmjerene vrijednosti su izrazito niske u odnosu na vodu iz rijeke Krke, odnosno koncentracija otopljenog kisika je 5,53 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, a zasićenje kisikom samo 66 % (Tablica 1). KPK u obje sezone ima najviše vrijednosti u rijeci Krki kod grada Knina u odnosu na izvor (2,75 u lipnju 2015. i 4,40 u svibnju 2016.) dok u industrijskoj otpadnoj vodi iznosi 3,30 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, što prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) ne prelazi granične vrijednosti za vodu dobrog ekološkog stanja. Koncentracije hranjivih soli,

odnosno nitrata, nitrita i ortofosfata, su uglavnom veće u uzorcima vode s postaje kod Knina, u odnosu na izvor. Prema graničnim vrijednostima navedenim u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) zabilježene su vrijednosti ispod dobrog ekološkog stanja u svibnju 2016. za nitrate i ortofosfate na obje postaje te za ortofosfate u industrijskoj otpadnoj vodi, a u listopadu 2015. za ortofosfate na izvoru rijeke Krke (Tablica 1).

**Tablica 1** Osnovni fizikalno-kemijskih čimbenici kakvoće vode rijeke Krke. Podvučene vrijednosti su ispod graničnih vrijednosti za vode dobrog ekološkog stanja prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/13).

|                                                       | Izvor rijeke Krke |               | Dio toka rijeke Krke nizvodno od industrijskog i komunalnog ispusta grada Knina |               | Industrijske otpadne vode iz tvornice vijaka |
|-------------------------------------------------------|-------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|
|                                                       | Listopad 2015.    | Svibanj 2016. | Listopad 2015.                                                                  | Svibanj 2016. | Svibanj 2016.                                |
| Temperatura vode/ °C                                  | 10,5              | 9,6           | 11,3                                                                            | 11,5          | 19,1                                         |
| pH                                                    | 7,60              | 7,70          | 7,75                                                                            | 8,09          | 7,31                                         |
| Električna vodljivost/ $\mu\text{S cm}^{-1}$          | 369,0             | 355,0         | 417,0                                                                           | 401,0         | 573,0                                        |
| TDS/ $\text{mg L}^{-1}$                               | 184,5             | 178,9         | 208,0                                                                           | 201,0         | 280,0                                        |
| Otopljeni kisik/ $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$       | 11,5              | 11,1          | 9,72                                                                            | 12,07         | 5,53                                         |
| Zasićenje kisikom/ %                                  | 106,2             | 100,2         | 91,0                                                                            | 114,3         | 66,0                                         |
| KPK <sub>KMnO4</sub> / $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ | 0,98              | 2,75          | 0,35                                                                            | 4,40          | 3,30                                         |
| Nitrati/ $\text{mg N L}^{-1}$                         | 0                 | <u>0,74</u>   | 0,36                                                                            | <u>1,19</u>   | 0,57                                         |
| Nitriti/ $\text{mg N L}^{-1}$                         | 0                 | 0,01          | 0                                                                               | 0,08          | 0,02                                         |
| Ortofosfati/ $\text{mg P L}^{-1}$                     | <u>0,62</u>       | <u>0,04</u>   | 0                                                                               | <u>0,04</u>   | <u>0,07</u>                                  |

TDS - ukupno otopljene soli, KPK - kemijska potrošnja kisika

#### 4.1.2. Metali u vodi

Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke izmjerene su na postajama izvor i Knin u listopadu 2015. i svibnju 2016. te u uzorcima iz bazena s industrijskom otpadnom vodom obližnje tvornice vijaka u svibnju 2016. (Tablica 2). Koncentracije svih metala su u svibnju 2016. najviše u industrijskoj otpadnoj vodi, dok je u obje sezone vidljivo da su koncentracije gotovo svih metala povišene u vodi uzorkovanoj na postaji kod grada Knina nizvodno od ulijevanja otpadnih voda u odnosu na izvor rijeke Krke. Statistički značajna razlika postoji za sve metale izmjerene u industrijskoj otpadnoj vodi u odnosu na barem jednu postaju na rijeci Krki, s izuzetkom Cd (Tablica 2). Usporedbom koncentracija metala između postaja izvor i Krka kod Knina uočava se značajna razlika u listopadu 2015. za Fe, Rb, K, Mg, Na i Ca, kada su svi navedeni metali bili povišeni u vodi kod Knina, osim Mg koji je bio viši na izvoru rijeke Krke. U svibnju 2016. statistički značajna razlika u koncentracijama metala između izvora rijeke Krke i dijela toka kod grada Knina postoji za As, Rb i Cd, koji su svi bili povišeni kod grada Knina (Tablica 2). Zabilježene su i sezonske razlike između koncentracija metala, statistički značajne na obje postaje za Mn, Rb, K, Na i Ca, na izvoru rijeke Krke za Fe, a na dijelu toka nizvodno od grada Knina za Cr, Zn i Mg (Tablica 2). Na sve tri postaje su koncentracije ukupno otopljenog Cu i Pb bile ispod granice detekcije, dok je u rijeci Krki isto zabilježeno na obje postaje za Cs te na izvoru u listopadu 2015. za Zn i u svibnju 2016. za Se (Tablica 2).

**Tablica 2** Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke ( $\mu\text{g L}^{-1}$  za mikroelemente;  $\text{mg L}^{-1}$  za makroelemente, srednja vrijednost  $\pm$  S.D.). Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između sezona na pojedinoj postaji (izvor rijeke Krke i nizvodno od grada Knina) istaknuta je oznakom "\*" (t-test); statistički značajna razlika između postaja za uzorkovanje u listopadu 2015. istaknuta je slovom "a" (t-test), dok je za uzorkovanje u svibnju 2016. istaknuta slovima "A, B, C" (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis, različito slovo označava da postoji značajna razlika).

|    |                      | Listopad<br>2015.    |                                                                                       | Svibanj<br>2016.     |                                                                                       |                                                    |
|----|----------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|    |                      | Izvor rijeke<br>Krke | Dio toka rijeke Krke nizvodno<br>od industrijskog i komunalnog<br>ispusta grada Knina | Izvor rijeke<br>Krke | Dio toka rijeke Krke nizvodno<br>od industrijskog i komunalnog<br>ispusta grada Knina | Industrijske<br>otpadne vode iz<br>tvornice vijaka |
| As | $\mu\text{g L}^{-1}$ | $0,13 \pm 0,03$      | $0,2 \pm 0,03$                                                                        | $0,1 \pm 0,02$ A     | $0,15 \pm 0,01$ B                                                                     | $0,26 \pm 0,02$ C                                  |
| Cd |                      | $0,01 \pm 0,003$     | $0,01 \pm 0,004$                                                                      | $0,005 \pm 0,001$    | $0,005 \pm 0,002$                                                                     | $0,09 \pm 0,005$                                   |
| Cr |                      | $0,09 \pm 0,001$     | $0,60 \pm 0,34$ *                                                                     | $0,11 \pm 0,009$ A   | $0,46 \pm 0,007$ A *                                                                  | $8,36 \pm 0,29$ B                                  |
| Cs |                      | < LOD                | < LOD                                                                                 | < LOD                | < LOD                                                                                 | $0,09 \pm 0,001$                                   |
| Cu |                      | < LOD                | < LOD                                                                                 | < LOD                | < LOD                                                                                 | < LOD                                              |
| Fe |                      | $0,91 \pm 0,37$ a *  | $4,88 \pm 0,37$ a                                                                     | $4,04 \pm 0,37$ A *  | $5,16 \pm 0,85$                                                                       | $4300 \pm 35$ B                                    |
| Mn |                      | $0,1 \pm 0,008$ *    | $3,86 \pm 0,15$ *                                                                     | $0,03 \pm 0,001$ A * | $2,97 \pm 0,26$ *                                                                     | $432,1 \pm 18,3$ B                                 |
| Pb |                      | < LOD                | < LOD                                                                                 | < LOD                | < LOD                                                                                 | < LOD                                              |
| Rb |                      | $0,25 \pm 0,003$ a * | $0,45 \pm 0,007$ a *                                                                  | $0,26 \pm 0,001$ A * | $0,32 \pm 0,02$ B *                                                                   | $2,47 \pm 0,03$ C                                  |
| Se |                      | $0,08 \pm 0,022$     | $0,1 \pm 0,014$                                                                       | < LOD                | $0,09 \pm 0,06$ A                                                                     | $9,31 \pm 0,22$ B                                  |
| Tl |                      | $0,004 \pm 0$        | $0,005 \pm 0$                                                                         | $0,005 \pm 0$ A      | $0,005 \pm 0,001$ A                                                                   | $0,14 \pm 0,03$ B                                  |
| Zn |                      | < LOD                | $20,4 \pm 5,2$ *                                                                      | $11,07 \pm 5,02$ A   | $17,9 \pm 1,25$ *                                                                     | $16095,3 \pm 133,1$ B                              |
| K  | $\text{mg L}^{-1}$   | $0,34 \pm 0,005$ a * | $0,67 \pm 0,02$ a *                                                                   | $0,29 \pm 0,003$ A * | $0,39 \pm 0,001$ *                                                                    | $22,3 \pm 0,6$ B                                   |
| Mg |                      | $9,52 \pm 0,14$ a    | $9,06 \pm 0,08$ a *                                                                   | $10,05 \pm 0,18$ A   | $10,08 \pm 0,09$ A *                                                                  | $15,3 \pm 0,14$ B                                  |
| Na |                      | $1,36 \pm 0,01$ a *  | $1,85 \pm 0,04$ a *                                                                   | $1,96 \pm 0,02$ A *  | $3,57 \pm 0,05$ *                                                                     | $141,8 \pm 1,26$ B                                 |
| Ca |                      | $69,03 \pm 0,56$ a * | $83,09 \pm 0,02$ a *                                                                  | $59,62 \pm 0,26$ A * | $69,88 \pm 1,06$ B *                                                                  | $121,8 \pm 1,7$ C                                  |

#### **4.2. Biometrijski pokazatelji jedinki potočne pastrve**

Na izvoru rijeke Krke je u obje sezone ulovljeno 16 jedinki potočne pastrve, dok je u dijelu toka nizvodno od grada Knina u listopadu 2015. ulovljeno 20, a u svibnju 2016. 16 jedinki. Na izvoru je u obje sezone ulovljeno više ženki potočne pastrve, dok je na postaji kod Knina u obje sezone ulovljen isti broj ženki i mužjaka (Tablica 3). Razlike između postaja se očituju u statistički značajno višim vrijednostima mase jetre i gonada u proljeće te kondicijskog indeksa u obje sezone u riba ulovljenih kod Knina u odnosu na izvor rijeke Krke. Sezonske razlike su značajnije te se očituju u značajno višim vrijednostima pokazatelja biometrije riba na postajama izvor i Knin u listopadu u odnosu na svibanj (Tablica 3). Gonadosomatski indeks (GSI) je na obje postaje statistički značajno viši u listopadu, dok su hepatosomatski (HSI) i kondicijski indeks (KI) značajno povišeni u svibnju na obje postaje (Tablica 3).

**Tablica 3** Biometrijski parametri jedinki potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) uzorkovanih na 2 postaje u rijeci Krki u listopadu 2015. i svibnju 2016. godine (srednja vrijednost  $\pm$  S.D. i raspon). Velikim slovima (A, B) označene su statistički značajne razlike između postaja, a zvjezdicom (\*) su označene statistički značajne razlike između dviju sezona.

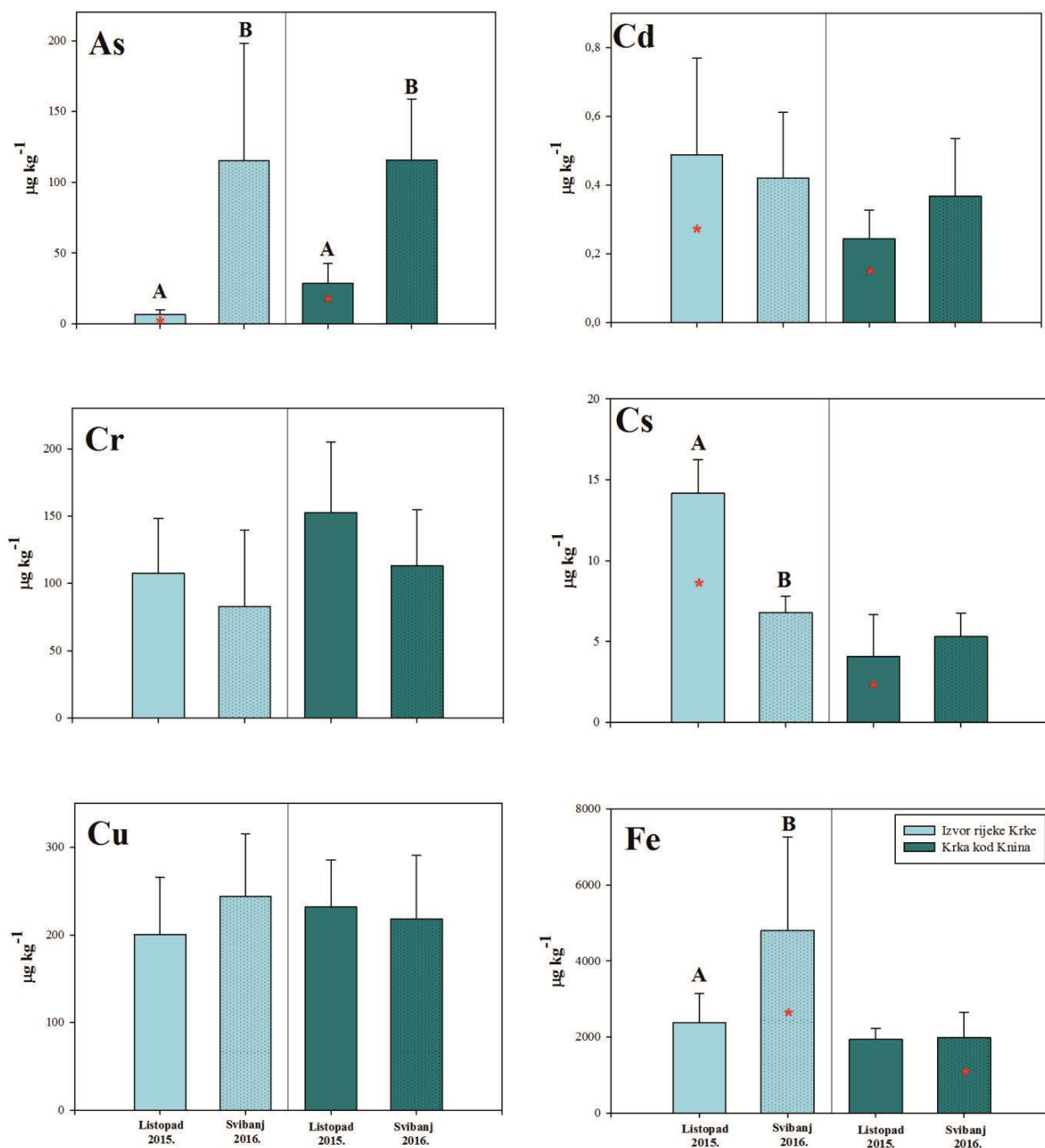
| Biometrijski parametri                  |    | Izvor rijeke Krke                             |                                                 | Dio toka rijeke Krke uz grad Knin              |                                                 |
|-----------------------------------------|----|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                         |    | Listopad 2015.<br>n=16                        | Svibanj 2016.<br>n=16                           | Listopad 2015.<br>n=20                         | Svibanj 2016.<br>n=16                           |
| Ukupna dužina (cm)                      |    | 24,15 $\pm$ 4,29 *<br>(18,0 - 30,8)           | 18,36 $\pm$ 1,97 *<br>(15,20 - 22,10)           | 23,35 $\pm$ 5,49 *<br>(13,0 - 31,8)            | 19,64 $\pm$ 3,19 *<br>(13,8 - 26,7)             |
| Ukupna masa (g)                         |    | 152,71 $\pm$ 77,44 *<br>(59,53 - 303,70)      | 66,10 $\pm$ 19,77 *<br>(63,60 - 107,2)          | 167,24 $\pm$ 108,96 *<br>(22,15 - 424,3)       | 96,01 $\pm$ 45,49 *<br>(31,45 - 200,7)          |
| Masa jetre (g)                          |    | 1,39 $\pm$ 0,89 *<br>(0,58 - 3,70)            | 0,82 $\pm$ 0,28 <sup>A,*</sup><br>(0,46 - 1,48) | 1,74 $\pm$ 1,33<br>(0,21 - 5,13)               | 1,49 $\pm$ 0,93 <sup>B</sup><br>(0,38 - 4,02)   |
| Masa gonada (g)                         |    | 6,19 $\pm$ 7,30 *<br>(0,09 - 24,15)           | 0,25 $\pm$ 0,19 <sup>A,*</sup><br>(0,10 - 0,74) | 4,89 $\pm$ 5,62 *<br>(0,01 - 15,28)            | 0,14 $\pm$ 0,07 <sup>B,*</sup><br>(0,05 - 0,27) |
| Spol                                    | ♀  | 10                                            | 10                                              | 10                                             | 8                                               |
|                                         | ♂  | 5                                             | 6                                               | 10                                             | 8                                               |
|                                         | ND | 1                                             | /                                               | /                                              | /                                               |
| Gonadosomatski indeks / %               |    | 3,72 $\pm$ 2,49 *<br>(0,11 - 8,08)            | 0,4 $\pm$ 0,35 <sup>*,A</sup><br>(0,13 - 1,39)  | 2,56 $\pm$ 2,81*<br>(0,02 - 7,59)              | 0,15 $\pm$ 0,06 <sup>B,*</sup><br>(0,08 - 0,25) |
| Hepatosomatski indeks / %               |    | 0,92 $\pm$ 0,25 *<br>(0,53 - 1,36)            | 1,27 $\pm$ 0,26 *<br>(0,88 - 1,97)              | 1,01 $\pm$ 0,22 *<br>(0,77 - 1,81)             | 1,5 $\pm$ 0,47 *<br>(1,06 - 3,04)               |
| Kondicijski indeks / g cm <sup>-3</sup> |    | 1,00 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup><br>(0,84 - 1,14) | 1,04 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup><br>(0,95 - 1,16)   | 1,12 $\pm$ 0,1 <sup>b,*</sup><br>(0,98 - 1,38) | 1,18 $\pm$ 0,09 <sup>B,*</sup><br>(1,05 - 1,37) |



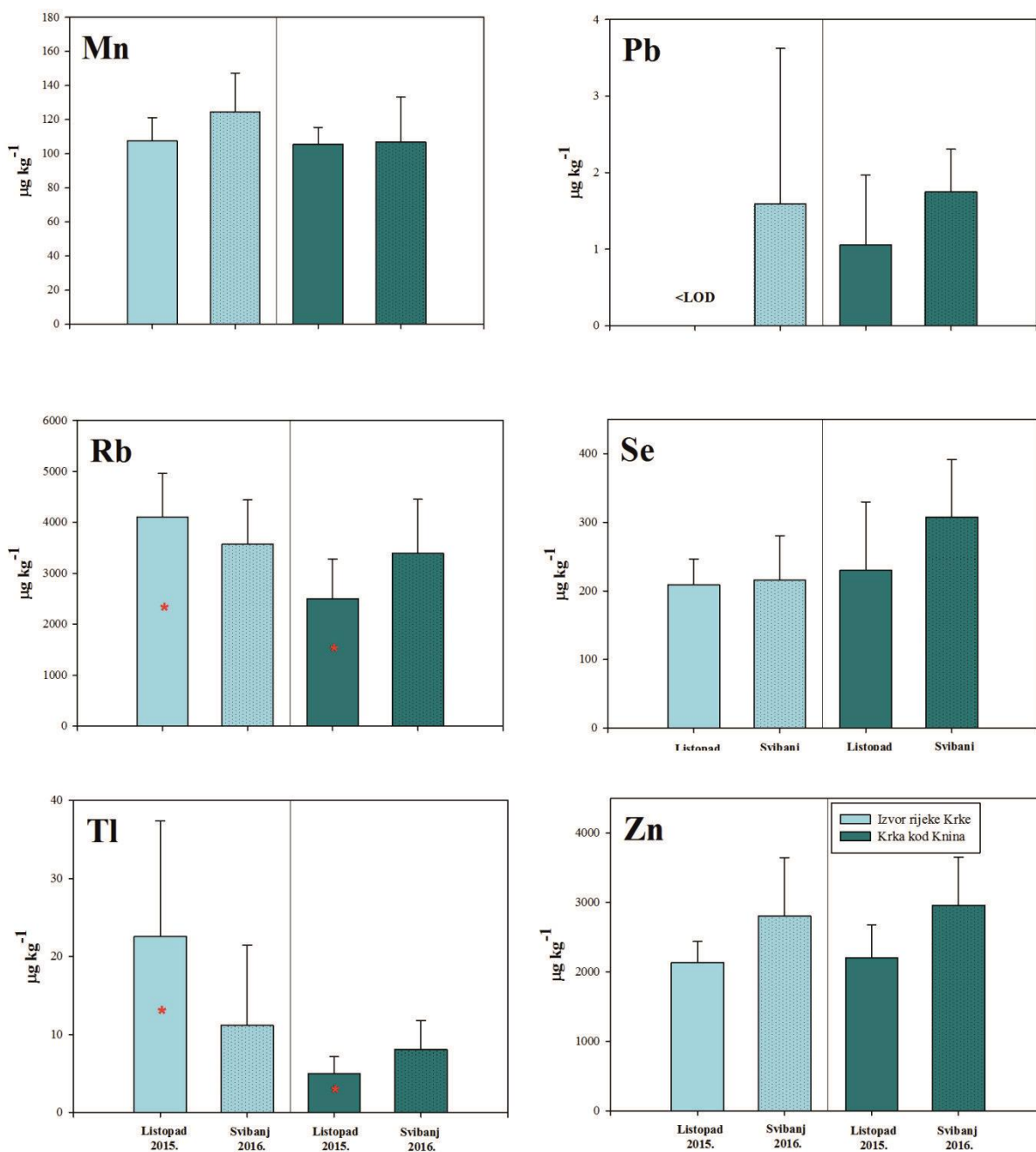
### 4.3. Metali u mišiću pastrve

Koncentracije metala u mišiću potočne pastrve izmjerene su u duplikatu na dvije postaje, izvoru rijeke Krke i dijelu toka nizvodno od grada Knina, kako bi dobili informaciju o biološki dostupnim koncentracijama metala. Uz to, s obzirom da se mišićno tkivo koristi u prehrani, izmjerene koncentracije metala u mišićima riba mogu poslužiti za procjenu sigurnosti konzumacije pastrva iz rijeke Krke prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012). Iako je koncentracija većine ukupno otopljenih metala u vodi povišena kod grada Knina, u mišiću riba s iste postaje su samo koncentracije As, Cr i Se povišene u usporedbi s ribama iz izvora rijeke Krke, statistički značajno za As u listopadu 2015. (Slike 14a i 14b). Suprotno, u mišićima riba iz izvora rijeke Krke su u odnosu na ribe ulovljene kod grada Knina povišene koncentracije Cd, Cs, Fe, Rb i Tl, statistički značajno za sve navedene metale u jesen, s izuzetkom Fe u proljeće (Slike 14a i 14b).

Statističkom analizom potvrđene su i statistički značajne razlike u izmjerenim koncentracijama metala između sezona. Koncentracija As je statistički značajno povišena u svibnju na obje postaje, Cs je značajno viši u listopadu na izvoru, u odnosu na uzorke s iste postaje u svibnju, dok su koncentracije Fe značajno više u svibnju na izvoru, u odnosu na listopad (Slike 14a i 14b).



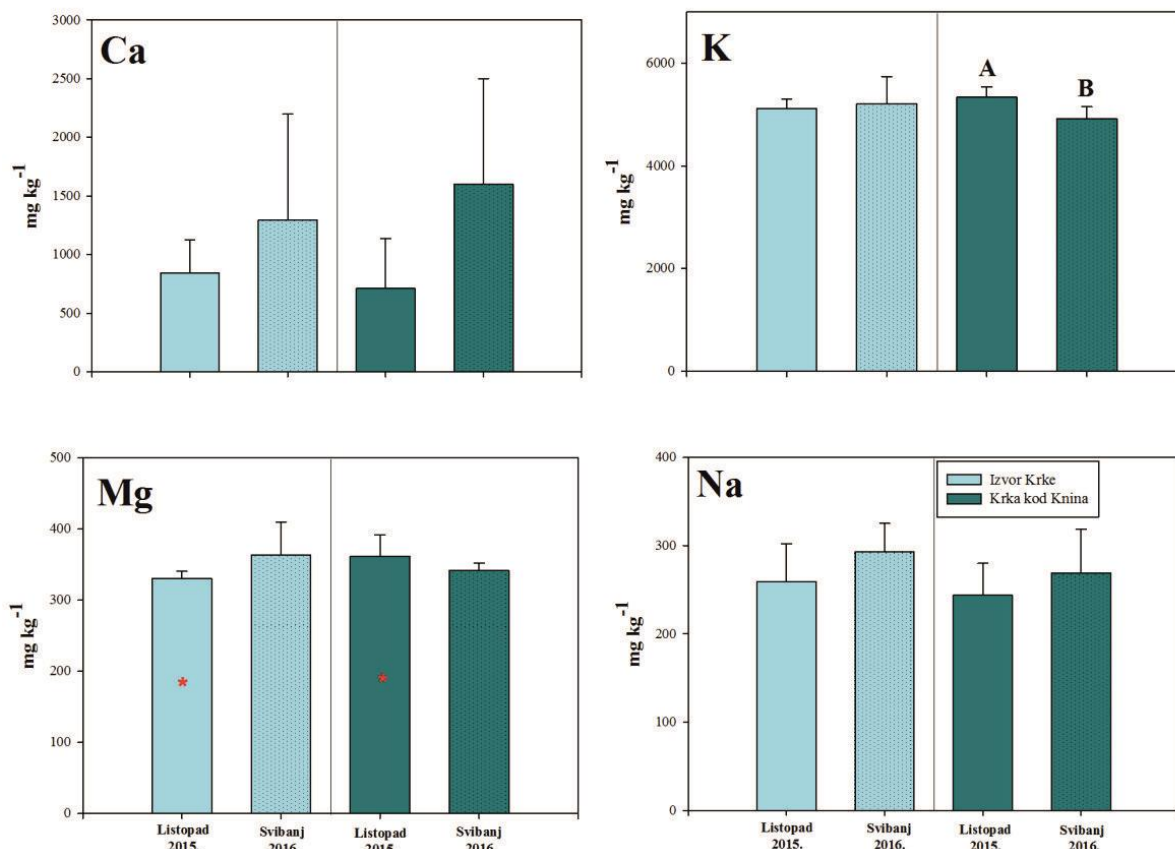
**Slika 14a** Koncentracije mikroelemenata (As, Cd, Cr, Cs, Cu, Fe,  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , srednja vrijednost  $\pm$  S.D.) izmjerene u razgrađenom mišiću pastrve. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između sezona (proljeće, jesen) na pojedinoj postaji istaknuta je slovima "A, B" (t-test); statistički značajna razlika između postaja (izvor rijeke Krke i dio toka nizvodno od grada Knina) u istoj sezoni istaknuta je oznakom "\*" (t-test).



**Slika 14b** Koncentracije mikroelemenata (Mn, Pb, Rb, Se, Tl, Zn,  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , srednja vrijednost  $\pm$  S.D.) izmjerene u razgrađenom mišiću pastrve. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između sezona (proljeće, jesen) na pojedinoj postaji istaknuta je slovima "A, B" (t-test); statistički značajna razlika između postaja (izvor rijeke Krke i dio toka nizvodno od grada Knina) u istoj sezoni istaknuta je oznakom "\*" (t-test).

Na Slici 15 prikazane su izmjerene koncentracije makroelemenata u mišiću potočne pastrve iz rijeke Krke. Koncentracije Mg su statistički značajno više u mišićima riba s postaje Knin u listopadu, dok su koncentracije ostalih makroelemenata usporedive između

postaja (Slika 15). Sezonske razlike su statistički značajne za K u mišiću riba s postaje kod Knina, s višim vrijednostima u listopadu u odnosu na svibanj. Ca i Na su povišeni u proljeće na obje postaje, ali bez statističke značajnosti (Slika 15).



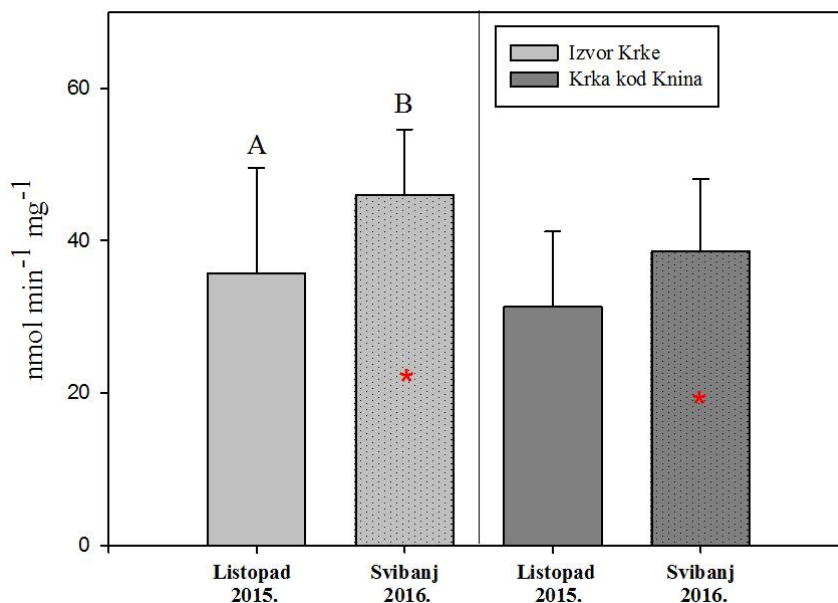
**Slika 15** Koncentracije makroelemenata (Ca, K, Mg, Na, mg kg<sup>-1</sup>, srednja vrijednost  $\pm$  S.D.) izmjerene u razgrađenom mišiću pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke i u dijelu toka nizvodno od grada Knina. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između sezona ( proljeće, jesen) na pojedinoj postaji istaknuta je slovima "A, B" (t-test); statistički značajna razlika između postaja (izvor rijeke Krke i dio toka nizvodno od grada Knina) u istoj sezoni istaknuta je oznakom "\*" (t-test).

#### 4.4. Biomarkeri

Kako bi se odredio utjecaj metala i ostalih zagađivala prisutnih u vodi rijeke Krke na biotu, izmjerene su koncentracije malondialdehida u jetri te aktivnost acetilkolinesteraze u mišićima pastrva ulovljenih na lokaciji izvor i kod grada Knina nizvodno od ulijevanja otpadnih voda.

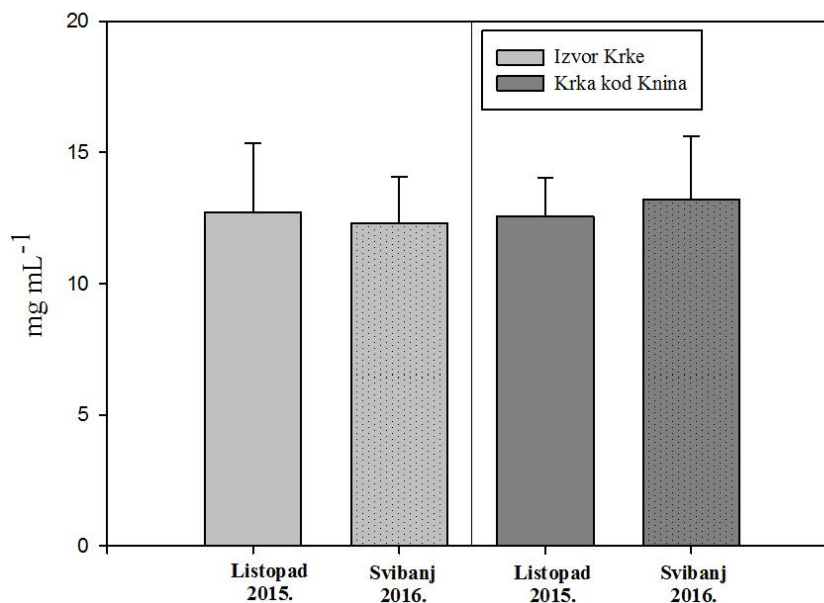
### 4.3.1. Acetilkinesteraza i ukupni proteini

U obje sezone, izmjerena aktivnost AChE je manja u riba s postaje Knin u odnosu na ribe s izvora rijeke Krke, statistički značajno u svibnju 2016. godine. Usporedba između sezona ukazuje da je aktivnost AChE niža u listopadu 2015. u odnosu na svibanj 2016. na obje postaje, a u riba s izvora je ta razlika i statistički značajna (Slika 16).



**Slika 16** Aktivnost AChE izmjerena u PMF mišića potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke i u rijeci Krki kod grada Knina ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , srednja vrijednost  $\pm$  S.D.). Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između sezona (jesen, proljeće) na pojedinoj postaji istaknuta je slovima "A, B" (t-test); statistički značajna razlika između postaja (izvor rijeke Krke i nizvodno od grada Knina) u pojedinoj sezoni istaknuta je oznakom "\*" (t-test).

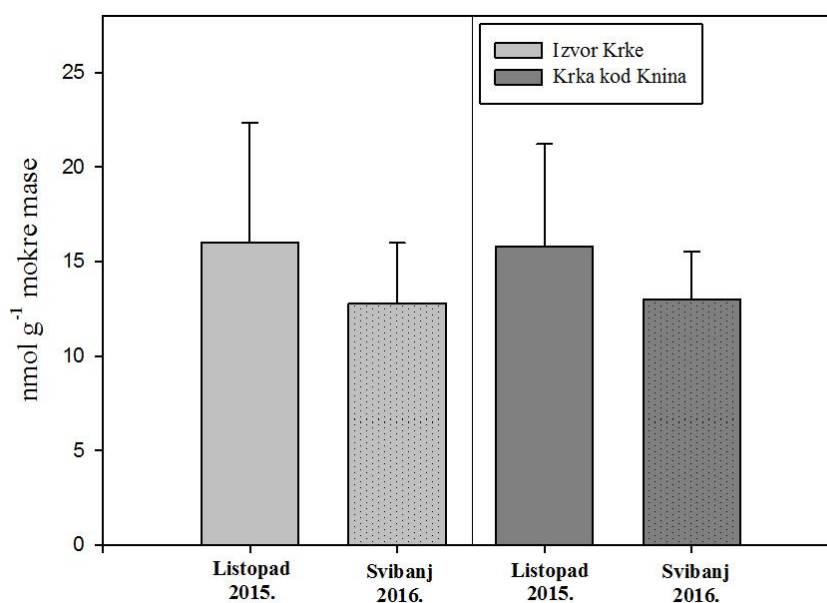
Koncentracije ukupnih proteina izmjerenih u PMF mišića pastrve iz rijeke Krke usporedive su na obje lokacije i za obje sezone te nema statistički značajnih odstupanja (Slika 17).



**Slika 17** Koncentracija ukupnih proteina izmjerenih u PMF mišića potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke i u rijeci Krki kod grada Knina (mg mL<sup>-1</sup>, srednja vrijednost ± S.D.).

#### 4.3.2. Malondialdehid

U obje sezone su u uzorcima jetre potočne pastrve koncentracije MDA usporedive između postaja. Uočava se razlika između sezona, s povišenim koncentracijama MDA u jesen u odnosu na proljeće na obje postaje, ali bez statistički značajne razlike (Slika 18).



**Slika 18** Koncentracije MDA izmjerene u jetri potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke i u rijeci Krki kod grada Knina (nmol g<sup>-1</sup> mokre mase, srednja vrijednost ± S.D.).

## 5. RASPRAVA

Dalmatinske krške rijeke jedne su od najvećih hrvatskih prirodnih bogatstava. Velika bioraznolikost, čisti i netaknuti dijelovi tokova i specifičnosti poput sedrenih barijera, samo su neki od razloga zašto ih je potrebno zaštititi. Ihtiofauna krških rijeka izrazito je značajna zbog brojnih mediteranskih i hrvatskih endema. Čak 13 hrvatskih slatkovodnih endema živi samo u dalmatinskim krškim rijekama (Duplić, 2008). U ovom je istraživanju kao bioindikatorski organizam korištena potočna pastrva, predstavnik ihtiofaune rijeke Krke, kako bi na temelju biomarkera izloženosti zagađivačima u jetri i mišiću, kao i koncentracija metala u mišiću, procijenili antropogeni utjecaj na riblju populaciju, sigurnost konzumacije pastrve u ljudskoj prehrani te u konačnici kakvoću vode rijeke Krke. Uz navedene biološke pokazatelje izmjerene u tkivima potočne pastrve, određene su i koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke te fizikalno-kemijski čimbenici kao pokazatelji ekološkog stanja vode rijeke Krke. Dosad nije provedeno sveobuhvatno istraživanje utjecaja točkastih izvora onečišćenja smještenih uz grad Knin, a njihov utjecaj je od iznimne važnosti jer su smješteni samo 2 km uzvodno od granice Nacionalnog parka Krka.

### 5.1. Kakvoća vode rijeke Krke na temelju fizikalno-kemijskih čimbenika i koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi

Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013), kojom su definirane mjere zaštite voda u Republici Hrvatskoj, kao i procjena stanja i klasifikacija kakvoće vode, rijeka Krka pripada dinarskoj primorskoj subregiji (oznaka: HR-R\_15b) te su prema tome evaluirani podaci o fizikalno-kemijskim čimbenicima vode dobiveni u istraživanju. Ukupni vodotok rijeke Krke karakteriziran je brojnim pritocima i podzemnim krškim izvorima čije bujanje ovisi o godišnjim dobima i padalinama (Jukić, 2006). S obzirom na to da krš grade stijene koje su topive u vodi (karbonatne stijene, gips, različite soli), bujanje podzemnih krških izvora utječe na kemijski sastav vode rijeke Krke i posljedično može uzrokovati odstupanja od očekivanih izmjerenih vrijednosti nekih čimbenika i koncentracija određenih metala. Fizikalno-kemijski čimbenici važni su faktori koji utječu na metabolizam i fiziologiju živih organizama u vodi, kao i na kruženje tvari u vodenom sustavu, mikrobiološku razgradnju, sve procese koji se odvijaju u vodi, pa čak i na dostupnost određenih zagađivala u vodi (Amiard, 2013). Za metale je karakteristično da se, za razliku

od organskih zagađivala, jednom uneseni u ekosustav ne mogu razgraditi već u njemu ostaju i kruže u biogeokemijskom ciklusu (Branica, 1999).

#### 5.1.1. Fizikalno-kemijski čimbenici

Temperatura vode vrlo je bitan abiotički faktor za sve vodene organizme. Većina vodenih organizama nema mogućnost regulacije tjelesne temperature, već ovise o temperaturi vode u kojoj obitavaju. S druge strane organizmi poput riba, koje su ektotermne, mogu donekle regulirati vlastitu temperaturu tijela, no velika odstupanja od optimalnih vrijednosti mogu uzrokovati vanjski stresori, što posljedično uzrokuje i znatno povišenu potrošnju energije kako bi se održala željena tjelesna temperatura (Dodds, 2002). Temperatura vode utječe i na koncentracije otopljenog kisika u vodi, odnosno pri višim temperaturama manje je otopljenog kisika što značajno utječe na akvatičke organizme, kojima se u stanjima povišene temperature poveća i potreba za kisikom (Jackson i sur., 2001). U obje sezone su vrijednosti temperature vode bile blago povišene na postaji kod Knina. Razlog tome mogu biti ispusti komunalnih otpadnih voda kao i različite mehaničke promjene obala i korita rijeke čime se povećava insolacija, sastav sedimenta i brzina toka rijeke. Ipak, u obje sezone izmjerene vrijednosti na izvoru rijeke Krke i dijelu toka kod grada Knina ne odstupaju od očekivanih za navedeno doba godine. Temperatura u bazenu s industrijskom otpadnom vodom bila je najviša (19,1 °C, Tablica 1), što je relativno visoka vrijednost u odnosu na vodu rijeke Krke, ali je očekivana s obzirom na to da se radi o stajaćoj otpadnoj vodi bez protoka.

pH vrijednost vode ima veliki utjecaj na sve žive organizme koji u njoj obitavaju. Ako pH vrijednost neke vodene površine izlazi iz optimalnih okvira za žive organizme, smanjuje se raznolikost vrsta tog vodenog sustava (Jackson i sur., 2001). Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) granična pH vrijednost vrlo dobrog ekološkog stanja je u rasponu 7,4-8,5, unutar kojeg su izmjerene pH vrijednosti u vodi rijeke Krke na obje postaje, dok je pH u bazenima s industrijskom otpadnom vodom ispod navedenog raspona (7,31, Tablica 1) što je i očekivano jer se radi o otpadnoj vodi. Vodljivost i TDS važan su pokazatelj ekološkog stanja vode i imaju velik utjecaj na metabolizam živih organizama u vodi. Vodljivost je mjera sposobnosti vode da provodi elektricitet i ovisi o količini otopljenih tvari u vodi te je proporcionalna s TDS. Ukupno otopljene soli uglavnom čine kationi  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  te anioni karbonata, hidrogenkarbonata, klorida, sulfata i nitrata (Matonićkin Kepčija, 2003). Količina otopljenih soli, pa tako i



vodljivost, ovise o brojnim faktorima, poput isparavanja ili obilnih kiša koje mogu sezonski znatno mijenjati vrijednosti ovih čimbenika. Osim toga, geomorfološke i geološke karakteristike područja i sedimenta, kao i brzina otjecanja, također definiraju vodljivost i TDS neke vodene površine (Dodds, 2002). Ovi čimbenici imaju više vrijednosti na postaji uz grad Knin u odnosu na izvor rijeke Krke u obje sezone (Tablica 1). Iako značajnih odstupanja nema, takva raspodjela ukazuje na više otopljenih tvari u vodi rijeke Krke kod Knina što potvrđuje antropogeni utjecaj. U bazenu s industrijskom otpadnom vodom, očekivano su za vodljivost i TDS izmjerene znatno više vrijednosti u odnosu na postaje u rijeci Krki. Naime, kako se radi o otpadnim vodama iz metalne industrije pretpostavka je da se u njima nalazi i puno otopljenih metalnih iona koji utječu na visoke vrijednosti vodljivosti i TDS koje su 1,6 puta više u odnosu na izvor rijeke Krke (Tablica 1).

Kako bi se odredio režim kisika, izmjereni su ukupno otopljeni kisik, zasićenje kisikom i KPK. Zasićenje i ukupno otopljeni kisik proporcionalne su vrijednosti i ovise o temperaturi, atmosferskom tlaku, fotosintetskoj proizvodnji fitoplanktona i vodenog bilja te potrošnji od strane svih živih organizama (Dodds, 2002). Kada se koncentracija kisika dostupnog za živi svijet u vodi smanji, to uzrokuje značajni stres i u konačnici kroz dulji period može rezultirati ugibanjem organizama. Od izmjerenih vrijednosti zasićenja i koncentracije otopljenog kisika u obje sezone na postajama izvor i Knin, odstupaju vrijednosti iz listopada na postaji Knin, kada je koncentracija otopljenog kisika neznatno snižena na  $9,72 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ , a zasićenje kisikom na 91 %, što može ukazivati da je nedugo prije uzimanja uzorka puštena komunalna otpadna voda iz ispusta. U uzorcima vode iz bazena s industrijskom otpadnom vodom obje su vrijednosti znatno niže u odnosu na postaje u rijeci Krki što potvrđuje lošu kakvoću otpadnih voda (Tablica 1). KPK je mjera svih organskih i anorganskih spojeva u vodi koji su podložni oksidaciji pri kontaktu s jakim oksidansom te se najčešće određuju reakcijom s kalijevim permanganatom (Perić i sur., 2012). Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) izmjerene vrijednosti KPK u obje sezone potvrđuju da je voda na izvoru rijeke Krke vrlo dobrog ekološkog stanja, dok je na postaji kod grada Knina i u bazenu s industrijskom otpadnom vodom dobrog ekološkog stanja (Tablica 1).

Kako bi se procijenio udio hranjivih soli u vodi rijeke Krke, izmjerene su koncentracije nitrata, nitrita i ortofosfata. Dušik čini veliki postotak zraka (78 %) i biološki je vrlo značajan element, jer je u sastavu važnih bioloških molekula. Antropogeni učinak vidljiv je upravo prema značajnom porastu koncentracija dušika i dušikovih spojeva i u

zraku i u vodi. Ispušni plinovi automobila i industrije, mineralna gnojiva i otpadne vode, neki su od izvora dušikovih spojeva u okolišu (Piria, 2015). Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013), izmjerene koncentracije nitrita i nitrata uglavnom ukazuju da je voda rijeke Krke dobrog ili vrlo dobrog ekološkog stanja. Iznimka su nitrati izmjereni u svibnju na postajama Knin i izvor, gdje izmjerene vrijednosti ukazuju na pogoršanje kakvoće vode (Tablica 1). S obzirom da su navedene vrijednosti zabilježene u istoj sezoni kada je vodostaj rijeke Krke iznosio 142 cm, u odnosu na listopad 2015. kada je bio dvostruko viši (285 cm), pretpostavka je da se radi o kratkoročnoj pojavi, vjerojatno uzrokovanoj nižim vodostajem. Fosfor se u vodi najčešće nalazi u obliku anorganskih spojeva, ortofosfata te kao takav služi kao nutrijent vodenim organizmima. Fosfor je i jedan od glavnih gradivnih elemenata živih organizama gdje se uglavnom nalazi u obliku organskih spojeva te se ugibanjem vodenih organizama značajno mijenja udio fosfata u vodi (Frece i Markov, 2015). Najveći udio fosfata u vodi rijeka dolazi putem ispiranja gnojiva kroz poljoprivredne površine, a sam fosfor je najznačajniji element u vodi koji uzrokuje eutrofikaciju (Piria, 2015). Komunalne otpadne vode također su izvor fosfata, jer se fosfor nalazi u sastavu raznih deterdženata, ali i aditiva i drugih sastojaka u proizvodnji hrane (Sofilić, 2014). Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013), sve izmjerene vrijednosti koncentracije ortofosfata, osim u listopadu na postaji kod Knina, izvan su vrijednosti koje označavaju vodu dobre kakvoće te potvrđuju antropogeni utjecaj. Ističe se vrijednost ortofosfata izmjerena u listopadu na izvoru rijeke Krke, gdje je izmjereno čak  $0,62 \text{ mg L}^{-1}$  (Tablica 1). Razlog tome je vjerojatno kratkoročno onečišćenje, moguće uzrokovanom većom količinom padalina koje su pojačale ispiranje s okolnog tla.

### 5.1.2. Metali u vodi rijeke Krke

Povišene koncentracije metala u vodenim sustavima mogu imati značajan negativan učinak na žive organizme u njima. Koncentracije metala u prirodnim vodama najviše ovise o geokemijskim procesima sedimenta i o antropogenom utjecaju (Deb i Fukushima, 1999). U Krki kao krškoj rijeci je karakteristično prirodno variranje koncentracija metala pod utjecajem podzemnih krških izvora kao i trošenja stijena korita rijeke. Specifičnost krških rijeka je i poniranje u krške pukotine koje ne mora nužno biti vidljivo na površini. Zbog toga je poznavanje hidrologije i geomorfologije rijeke Krke i područja oko nje bitno je prilikom razmatranja potencijalnog onečišćenja, jer pojedini izvori zagađenja svoj maksimalni utjecaj mogu imati kilometrima dalje od samog mjesta ulaska u rijeku zbog podzemne povezanosti krških vodotoka (Cukrov, 2008). Nakon ulaska u vodeni sustav

metali mogu biti u ionskom obliku ili mogu tvoriti komplekse s drugim molekulama, pa se mogu akumulirati u sedimentu, u živim organizmima ili se nalaziti u vodenom stupcu. S obzirom da su prirodne koncentracije metala u krškim rijekama izrazito niske, svaki dodatni unos remeti prirodnu ravnotežu (Cukrov i sur., 2007) i može izazvati toksične učinke na živi svijet.

Potencijalni antropogeni izvori zagađenja rijeke Krke metalima su komunalne otpadne vode grada Knina i industrijske otpadne vode tvornice vijaka u Kninu. Vrijednosti gotovo svih metala su u obje sezone povišene u vodotoku rijeke Krke nizvodno od grada Knina u odnosu na izvor rijeke Krke, statistički značajno za Fe, Rb, Ca, K, Mg i K u listopadu te za As, Pb i Ca u svibnju. U vodi kod grada Knina je u listopadu zabilježena 4 do 6 puta veća koncentracija Mn, Cr i Fe u odnosu na izvor rijeke Krke, dok je koncentracija Zn na postaji Knin bila veća čak 20 puta (Tablica 2). Komunalne otpadne vode mogu sadržavati metale iz različitih izvora, no puno veći utjecaj na zagađenje metalima imaju otpadne vode iz industrije. Metalurška industrija koristi puno vode za hlađenje legura nakon procesa taljenja, pa je i količina otpadnih voda značajna. U proizvodnji vijaka uglavnom se koriste legure čelika i mjedi. Čelik je materijal sastavljen većinski od Fe, dok je mjed slitina Cu i Zn. Prilikom izrade čvrstih legura pogodnih za izradu vijaka, u čelik i mjed se dodaju drugi metali poput Mn, Si, Al i drugi (Gabrić i Šitić, 2012). U uzorcima iz bazena s industrijskom otpadnom vodom izmjerene su izrazito visoke vrijednosti za sve metale, a za Mn, Fe i Zn po nekoliko tisuća puta veće vrijednosti u odnosu na uzorke iz rijeke Krke. Prilikom pročišćavanja otpadnih voda koncentracija Zn, čija je koncentracija u industrijskim otpadnim vodama izrazito povišena, se nastoji smanjiti ispod  $3 \text{ mg L}^{-1}$  (Perić i sur., 2012). U industrijskoj otpadnoj vodi u ovom istraživanju izmjerena koncentracija Zn je čak  $16 \text{ mg L}^{-1}$ , što je daleko iznad prihvatljive koncentracije. Ono što posebno treba istaknuti je da prilikom većih oborina razina vode u jamama s industrijskom otpadnom vodom poraste dovoljno da se može prelići preko ruba jame u okolno područje i postoji mogućnost da ta voda uđe u rijeku Krku.

Vrijednosti Cd i Tl u obje sezone te Mg u svibnju su bile usporedive na izvoru rijeke Krke i dijelu vodotoka nizvodno od grada Knina, dok je koncentracija Mg u listopadu čak statistički značajna viša na izvoru rijeke Krke. Više vrijednosti Mg na izvoru mogu se objasniti pojačanom erozijom stijena i sedimenata rijeke Krke, jer se uz većinski

vapnenac u području toka rijeke Krke nalaze i dolomitne stijene koje sadrže Mg (Jezidžić, 2015).

## **5.2. Bioakumulacija metala u mišiću pastrva i procjena prehrambene sigurnosti**

Povišene koncentracije metala u vodi predstavljaju veliku opasnost za živi svijet u vodi. Kako je već spomenuto, metali se u vodi mogu nalaziti u različitim oblicima, što utječe i na njihovu biološku dostupnost, odnosno mogućnost da uđu u organizme i potencijalno djeluju toksično. Dokazano je da metali mogu uzrokovati oksidacijski stres u riba i da utječu na njihov rast i razvoj (Baker i sur., 1997). Od svih metala najopasniji su teški metali te je njihov utjecaj na žive organizme u vodi, kao i toksičnost na ljude, najviše istražena (Alibabić i sur., 2007). Termin teški metali odnosi se na metale koji imaju atomsku težinu veću od  $4\text{g/cm}^3$ , odnosno 5 ili više puta veću od vode (Hawkes, 1997). Od metala čije su koncentracije mjerene u ovom istraživanju, u teške metale se ubrajaju: Pb, Cd, Co, Fe, Zn, Cr i As. Teški metali predstavljaju opasnost jer su toksični u vrlo malim koncentracijama i mogu se bioakumulirati u vodenim sustavima (Miller i sur., 2002). Kako je nemoguće odrediti točnu biološki dostupnu koncentraciju metala u vodi, najbolji način da se procjeni onečišćenje metalima u vodenom ekosustavu je mjerenjem koncentracije metala u nekom indikatorskom organizmu (Kraemer i sur., 2006 u Dragun i sur., 2017). Riba su dobar pokazatelj izloženosti metalima u vodenim sustavima, jer kroz svoj razvoj i starenje, zaposjedaju različite trofičke razine (Burger i sur., 2002). Kako je potočna pastrva široko rasprostranjena po Europi, ali i šire (Mraković i sur., 2006), a pronađena je u čistim i onečišćenim vodama, dobar je bioindikator onečišćenja i dobra vrsta za provođenje biomonitoringa (Culioli i sur., 2009 u Dragun i sur., 2017).

Za svaki kontaminant koji se potencijalno može naći u namirnicama koje se koriste u prehrani, vlade i zdravstvene organizacije svake države propisuju njihove maksimalne dozvoljene koncentracije. Kako je riba česta namirnica u prehrani ljudi diljem svijeta, a ribe mogu akumulirati različite kontaminante iz okoliša, pa tako i metale (Van Campenhout i sur., 2009), određene su maksimalne dopuštene koncentracije Cd, Pb i Hg u mesu riba koje su navedene u Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 55/2011).

Pb je teški metal koji može na organizme djelovati kancerogeno, najčešće uzrokujući tumor želuca, pluća ili mozga (Steenland i Boffetta, 2000). Svi spojevi Pb su toksični i uzrokuju bolesti poput kardiovaskularnih poteškoća, moždanog udara i kognitivnog hendikepa (Draszawka – Bolzan, 2014). Pb je metal koji se najviše koristi u proizvodnji baterija, metalnoj industriji i proizvodnji oružja, a najčešći put unosa u tijelo je inhalacijom ili konzumacijom vode i hrane kontaminirane Pb (EPA 2011). Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 55/2011) granična dopuštena vrijednost olova u mesu ribe iznosi 0,30 mg/kg. Iako je koncentracija Pb u mišiću pastrva s postaje Knin povišena u odnosu na izvor, ona ne predstavlja opasnost za zdravlje, jer je daleko ispod maksimalne dopuštene koncentracije.

Već vrlo niske koncentracije Cd mogu toksično djelovati na žive organizme, pa su dopuštene koncentracije u hrani također vrlo niske. Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 55/2011) maksimalna dopuštena koncentracija Cd u mesu ribe iznosi 0,050 mg/kg. Sve izmjerene vrijednosti Cd u ovom istraživanju manje su od dopuštenih, stoga ne postoji rizik od konzumacije pastrve za ljudsko zdravlje.

Usporedba koncentracija metala između postaja, ukazuje na više koncentracije As, Cr, Pb i Se u riba ulovljenih kod grada Knina u odnosu na ribe s izvora rijeke Krke (Slike 14 i 15). Među navedenim metalima, As uz Pb također spada u neesencijalne metale. Iako nije naveden u Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 55/2011), As je klasificiran kao kancerogeni spoj i dokazana je njegova uloga u razvitku brojnih tumora kod ljudi (Chevrone, 2012). Osim kancerogenog učinka, najčešća bolest čiji je uzročnik As je bolest crnog stopala. Ova bolest najraširenija je u područjima Sjeverne Afrike, Azije i Južne Amerike, a uglavnom je uzrok As onečišćena pitka voda (Vasiljević, 2010). Prema Das i sur. (2004) maksimalna prihvatljiva koncentracija As u hrani je 1,0 mg/kg te su sve izmjerene vrijednosti u mišiću pastrve u ovom istraživanju manje od te koncentracije.

Suprotno, u mišićima riba iz izvora rijeke Krke izmjerene su povišene koncentracije Cd, Cs, Fe, Mn, Rb i Tl u odnosu na ribe ulovljene kod izvora rijeke Krke (Slike 14a i 14b). Razlog takve raspodjele metala je vjerojatno iz prirodnih izvora. Kao što je već spomenuto u sastavu različitih stijena prirodno se nalaze brojni metali i one mogu biti razlog pojave povišenih koncentracija nekih metala u okolišu, pa tako i u vodenim

organizmima. Primjerice, Cd se u prirodi nalazi u sastavu sulfidnih ruda Zn i Pb, rijetko kao samostalna ruda grinokit (CdS) (Drčić, 2014) te trošenjem tih stijena može doći do povišenih koncentracija kadmija u vodi i u vodenim organizmima. Poznato je da su krške rijeke bogate dolomitima iz kojih se oslobađa Cd (Cukrov i sur., 2008). Izmjerene koncentracije makroelemenata u mišiću pastrva su uglavnom usporedive između sezona i postaja. Značajno su više koncentracije Mg u listopadu u riba s postaje kod Knina u odnosu na izvor te K na postaji Knin u listopadu u odnosu na svibanj. K i Mg su u sastavu brojnih gnojiva koja se koriste u poljoprivredi (Magdić i Parić, 2015). K se nalazi u sastavu brojnih stijena, od kojih su neke, poput karbonata, topljive u vodi što utječe na koncentraciju K u vodi, dok se Mg nalazi u sastavu dolomita. U kućanstvima se K često nalazi u sastavu kemikalija, primjerice za omekšavanje vode (WHO, 2009) te tada otpadnim vodama dolazi u prirodne vode, pa je porast koncentracije K u mišiću pastrva s postaje kod grada Knina u listopadu vjerojatno posljedica lokalnog onečišćenja komunalnim otpadnim vodama.

Akumuliranje teških metala u mišiću pastrva predstavlja rizik za ljude koji pastrve koriste u svojoj prehrani. Koncentracije metala izmjerene u mišiću pastrva iz rijeke Krke nalaze se unutar dopuštenih razina te nema ozbiljnijih odstupanja. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da ne postoji rizik od toksičnih učinaka metala konzumacijom mesa pastrve iz rijeke Krke.

### **5.3. Procjena utjecaja onečišćenja na biotu praćenjem biometrijskih pokazatelja i biomarkera**

Zagađivala u rijeke dolaze iz različitih raspršenih i točkastih izvora. Određivanje njihove koncentracije u vodi daje informaciju o trenutnom stanju vode i eventualnom onečišćenju koje je nastalo, a u svrhu procjene njihovog utjecaja na biotu koriste se različiti biološki pokazatelji. Specifični biomarkeri, poput aktivnosti AChE i koncentracije MDA koji su mjereni u ovom istraživanju, nam mogu ukazati na prisustvo određenih zagađivala u vodi i na procjenu njihovog utjecaja na organizme.

Ovisno o tipu zagađivala, njihov utjecaj na životinje u vodi, pa tako i na ribe, je različit. Većina toksičnih spojevi prisutnih u zagađenim vodama uzorkuju značajan stres za organizme što utječe na rast, razvoj i razmnožavanje, ali i povećava mogućnost zaraze nekim patogenom. Organski materijal, koji uglavnom u rijeke dolazi komunalnim otpadnim vodama potiče rast bakterijskih populacija što može utjecati na koncentraciju

kisika u vodi, ali i uzrokovati različite bolesti riba (Austin, 1998). Utjecaj je dakle vrlo raznolik, a možemo ga detektirati i procijeniti pomoću specifičnih biomarkera.

Pastrve ulovljene kod grada Knina imale su u obje sezone veću masu u odnosu na pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te je posljedično i kondicijski indeks viši u pastrva ulovljenih kod grada Knina (Tablica 3). Osim između postaja, kondicijski indeks pokazuje i sezonsku varijabilnost i uglavnom je niži prije i tijekom mrijesta, kada ribe energiju ulažu u razvitak spolnih stanica. Kondicijski indeks pastrva s obje postaje je viši u svibnju, u odnosu na listopad, a kako se potočna pastrva mrijesti u kasnu jesen očekivano je u listopadu kondicijski indeks niži (Mrakovčić i sur., 2006). Dobivene vrijednosti GSI i HSI također odgovaraju očekivanim vrijednostima prema reproduktivnoj biologiji vrste, odnosno GSI ukazuje na reproduktivno razdoblje, a HSI prikazuje uhranjenost ribe jer se metabolička aktivnost i jetrene energetske rezerve povećaju kada je ribi dostupno puno hrane. Masa gonada je nekoliko desetaka puta veća u listopadu na obje postaje, u odnosu na svibanj, tako da je i GSI u listopadu statistički značajno povišen. HSI i masa jetre veći su u svibnju, u odnosu na listopad, jer su kroz proljeće do svibnja pastrve energiju unesenu hranom ulagale u rast i spremale kao zalihe u jetru, dok to u reproduktivskom periodu nije moguće (Tablica 3). Biometrijski pokazatelji ne ukazuju na značajno lošiju uhranjenost ili poremećaj rasta ili reproduktivnog ciklusa u riba s obje postaje.

Biomarkeri su biološki pokazatelji koji se mjere u tkivima, stanicama ili tjelesnim tekućinama i ukazuju na promjene nastale zbog prisutnosti određene toksične tvari (NRC 1987). Specifičnost biomarkera je izrazito bitna, jer precizno određivanje prisutnosti određenog zagađivala može utjecati na ranu reakciju i učinkovitu regulaciju unosa ili uklanjanje te tvari iz okoliša (Amiard-Triquet i sur., 2013). Inhibicija aktivnosti AChE jedan je od prvih biomarkera korišten u istraživanjima i monitoringu okoliša (Romeo i Giamberini, 2013). AChE je enzim koji regulira prijenos impulsa u organizmima i najčešće je proučavan kao biomarker neurotoksičnosti. Iako se uglavnom koristi pri procjeni izloženosti organofosfatima i karbamatima, potvrđeno je da i neki metali, poput Cd i Pb, mogu uzrokovati inhibiciju AChE (de Lima i sur., 2013). Inhibicija AChE dovodi do nakupljanja acetilkolina i posljedično hiperstimulaciju, što nakon nekog vremena dovodi do tetaničkih kontrakcija, paralize ili čak smrti (Halappa i sur., 2009). U ovom je istraživanju dokazana inhibicija AChE aktivnosti u riba ulovljenih kod grada Knina u odnosu na ribe s izvora rijeke Krke, statistički značajna u svibnju 2016. (Slika 16).

Inhibicija AChE aktivnosti je biološki pokazatelj koji ukazuje na izloženost riba organofosfatima, karbamatima te metalima. S obzirom da je većina metala u vodi i mišiću riba uzorkovanih kod grada Knina povišena, očekivan je utjecaj metala na staničnoj razini. Osim toga, navedeni pesticidi imaju svoju stalnu primjenu radi povećanja prinosa u poljoprivredi, a s obzirom da je na okolnom području grada Knina puno obradivih površina, inhibiciji AChE uz metale sigurno pridonosi i primjena pesticida.

MDA u biološkim sustavima nastaje procesom lipidne peroksidacije (Braunbeck i sur., 1998), do koje dolazi prilikom oksidativnog stresa te se najčešće koristi kao biomarker oksidativnog stresa. Tim procesom dolazi do oštećenja membrana stanica, ali i sama molekula MDA koja nastaje lipidnom peroksidacijom je toksična te u reakciji s proteinima i DNA potencijalno može djelovati mutageno (Del Rio i sur., 2005). Oksidacijski stres može biti potaknut promjenama fizikalno kemijskih parametara, primjerice saliniteta ili temperature, ali i prisutnošću različitih zagađivala u okolišu (Cossu i sur., 2000, Giguère i sur., 2003, Roméo i sur., 2003, Aït Alla i sur., 2006, Damiens i sur., 2007 u Amiard-Triquet i sur., 2013). Farombi i sur. (2007b) su dokazali da i metali mogu uzrokovati oksidativni stres, odnosno primijećeno je da proporcionalno s porastom bioakumulacije metala poput Zn i Pb, dolazi do porasta lipidne peroksidacije u stanicama, pa tako i porasta koncentracije MDA. Rezultati mjerenja koncentracija MDA u jetri pastrva s izvora rijeke Krke i s postaje kod Knina su usporedivi, a nisu uočene ni značajne sezonske razlike (Slika 18). Time ovakvi rezultati ukazuju da nije potvrđen značajan oksidativni stres u riba čije je stanište nizvodno od ulijevanja otpadnih voda kod grada Knina.



## 6. ZAKLJUČAK

Fizikalno-kemijski čimbenici izmjereni u uzorcima rijeke Krke ukazuju na pogoršanje kakvoće vode nizvodno od ulijevanja industrijskih i komunalnih otpadnih voda kod grada Knina. Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) izmjerene vrijednosti KPK, nitrata, nitrita i ortofosfata potvrđuju da je voda na izvoru rijeke Krke vrlo dobrog ekološkog stanja, dok je kod grada Knina ispod kategorije dobrog ekološkog stanja, a industrijska otpadna voda iz tvornice vijaka je prema većini izmjerenih čimbenika najlošije kakvoće.

Koncentracije gotovo svih izmjerenih ukupno otopljenih metala u vodi su u obje sezone povišene u vodotoku rijeke Krke nizvodno od ulijevanja otpadnih voda u odnosu na izvor rijeke Krke te ukazuju na antropogeni utjecaj kod grada Knina. Koncentracije metala u bazenima s industrijskom otpadnom vodom su znatno povišene u odnosu na vrijednosti u rijeci Krki, što ne iznenađuje s obzirom da se radi o metalurškoj industriji, no nužno je istaknuti da to predstavlja veliku opasnost za rijeku Krku zbog mogućeg otjecanja u pritoke rijeke Krke i podzemne vodotoke, pa tako ugrožava i samu rijeku Krku i opskrbu pitkom vodom.

Biometrijski parametri pastrva ulovljenih u rijeci Krki ne ukazuju na lošiju uhranjenost, poremećaj rasta ili reproduktivnog ciklusa u riba s obje postaje. Biomarkeri u potočne pastrve ukazuju na izloženost riba organofosfatima, karbamatima i metalima jer je dokazana inhibicija aktivnosti AChE u mišićima pastrva ulovljenih kod grada Knina u odnosu na izvor rijeke Krke, dok izmjerene koncentracije MDA u jetri ne ukazuju na oksidativni stres u pastrva iz rijeke Krke.

Izmjerene koncentracije metala u mišiću potočne pastrve su za većinu metala više u riba s postaje kod grada Knina u odnosu na izvor rijeke Krke. Ipak, prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 55/2011) koncentracije Cd i Pb ne prelaze dopuštene maksimalne koncentracije metala u riba koje se koriste u prehrani, stoga je ovim istraživanjem potvrđeno da su potočne pastrve iz rijeke Krke sigurne za konzumaciju u ljudskoj prehrani.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da postoji antropogeni utjecaj kod grada Knina te je nužno redovito pratiti kakvoću vode rijeke Krke uslijed opasnosti od ozbiljnog

onečišćenja koja prijeti rijeci Krki i Nacionalnom parku Krka zbog ispuštanja komunalnih otpadnih voda grada Knina i industrijskih otpadnih voda obližnje tvornice vijaka.

## 7. LITERATURA

- Alibabić B., Vahčić N., Bajramović M. (2007): Bioaccumulation of metals in fish of Salmonidae family and the impact on fish meat quality. *Environmental Monitoring and Assessment*, **131**: 349-364.
- Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Rainbow P. S. (2013): *Ecological Biomarkers: Indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press, Boca Raton.
- Amiard J.-C., Amiard-Triquet C. (2013): *Conventional Risk Assessment of Environmental Contaminants*. U: Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Rainbow P. S. (Ur.) *Ecological Biomarkers: Indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press, Boca Raton.
- de Andrade V. M., Silva J., Silva F. R., Heuser V. D., Dias J. F., Yoneama M. L., de Freitas T. R. O. (2004): Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **44** (5): 459-468.
- Anke M. K. (2004): *Essential and toxic effects of macro, trace and ultratrace elements in the nutrition of animals*. U: Merian E., Anke M. K., Ihnat M., Stoeppeler M. (Ur.) *Elements and their Compounds in the Environment*. 2nd Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bainy A. C. D., Gennari M. H. M., Paolo Di. M., de Almeida E. A. (2006): In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas* **19**(1): 35-39.
- Baker R. T. M., Martin P., Davies S. J. (1997): Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology*, **40**(1): 51-61
- Branica M. (1999): Tragovi metala u prirodnim vodama. Zbornik radova 2. Hrvatske konferencije o vodama u Dubrovniku, Hrvatske vode, Zagreb, 43-52.
- Burgeot T., Gagne F., Forget-Leray J., Bocquene G. (2010): Acetylcholinesterase: Methodology development of a biomarker and challenges of its application for biomonitoring. ICES CM 2010/F: 25.

- Bergamo P., Fedele E., Balestrieri M., Abrescia P., Ferrara L. (1998): Measurement of malondialdehyde levels in food by highperformance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 2171-2176.
- Braunbeck T., Hinton D. E., Streit B. (1998): *Fish ecotoxicology*. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.
- Brown M. T., Depledge M. H. (1998): Determinants of trace metal concentrations in marine organism. U: Langston W. J., Bebianno M. J. (Ur.): *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, 185-217.
- Campbell P. G. C., Stokes P. M. (1985): Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**: 2034-2049.
- Chervona Y., Arita A., Costa M. (2012): Carcinogenic metals and the epigenome: understanding the effect of nickel, arsenic, and chromium. *Metallomics*, **4**: 619-627.
- Chiras D. D. (2005): *Ecology and the environment*. U: Chiras D. D. (Ur.) *Human biology*. 5th Edition. Jones & Bartlett Pub, Sudbury, MA.
- Crompton T. R. (2007): *Toxicants in aqueous ecosystems. A guide for the analytical and environmental chemist*. 1st Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Cukrov N., Cmuk P., Kwokal Ž., Marguš D., Mlakar M., Omanović D. (2007): Ecotoxic trace metals in waters of "Krka" National Park – Croatia, *Proceedings of Second International Conference on Waters in Protected Areas*, Nakić Z. (Ur.), Zagreb: Croatian Water Pollution Control Society, 226-229.
- Cukrov N., Cmuk P., Mlakar M. i Omanović D. (2008): Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of self-purification. *Chemosphere*, **72**: 1559-1566.
- Čolović M. B., Krstić D. Z., Lazarević-Pašti T. D., Bondžić A. M., Vasić V. M. (2013): Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* **11**(3): 315-335.

- Das H. K., Mitrab A. K., Sengupta P. K., Hossain A., Islame F., Habbani G. (2004): Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study. *Environment International*, **30**(3): 383-387.
- Deb S. C., Fukushima T. (1999): Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. *International Journal of Environmental Studies*, **56**: 385-417.
- Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **15**(4): 316-328.
- Dodds W. K. (2002): *Freshwater Ecology: Concepts and environmental applications*. Academic Press. An Elsevier Science Imprint.
- Draszawka – Bolzan B. (2014): Effect of heavy metals in living organisms. *World Scientific News*, **5**: 26-34.
- Drčić D. (2014): Ekotoksikologija kadmija. *International Interdisciplinary Journal of Young Scientists from the Faculty of Textile Technology*, **4**: 66-77.
- Duplić A. (2008): *Slatkovodne ribe. Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja*. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb.
- Duruibe J. O., Ogwuegbu M. O. C., Ekwurugwu J. N. (2007): Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, **2**(5): 112-118.
- EPA - US Environmental protection agency (2011): Lead compounds Url: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/lead-compounds.pdf>
- Esterbauer T., Schaur R. J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, **11**: 81-128.
- Farombi E. O., Adelowo O. A., Ajimoko Y. R. (2007a): Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African catfish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **4**(2): 158-165.

- Farombi, E. O., Adewole, O. A., Ajimoko, Y. R.(2007b). Effect of Butachlor on Antioxidant Enzyme Status and Li-pid Peroxidation in Fresh Water African Catfish, (*Clarias gariepinus*). International Journal of Environmental Research and Public Health, **5**(5): 423-427.
- Florence T. M., Batley G. E. (1977): Determination of the chemical forms of trace metals in natural waters, with special reference to copper, lead, cadmium and zinc. Talanta, **24**: 151-158.
- Forstner U., Wittmann G. T. W. (1981): Metal Pollution in the Aquatic Environment. 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Gabrić I., Šitić S. (2012): Materijali 1. Konstrukcijsko strojarstvo. Sveučilište u Splitu. Sveučilišni odjel za stručne studije.
- Grizelj Šimić V. (2016): Kontrola izvora onečišćenja voda. Hrvatske vode, **96**: 147-160
- Gueraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P. M., Huc L., Jouanin I., Siems W., Uchida K. (2010): Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radical Research, **44**(10): 1098-1124.
- Harada M. (1995): Minamata Disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. Critical Reviews in Toxicology, **25**(1): 1-24.
- Hrvatske vode (2015a): Nacrt plana upravljanja vodnim područjima.
- Hrvatske vode (2015b): Metodologija uzorkovanja, laboratorijskih analiza i određivanja omjera ekološke kakvoće bioloških elemenata kakvoće.
- Jackson D. A., Peres-Neto P. R., Olden J. D. (2001): What controls who is where in freshwater fish communities – the roles of biotic, abiotic, and spatial factors. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **58**: 157-170.
- Jarup L. (2003): Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin, **68**: 167-182.
- Javna ustanova NP Krka, <http://www.npkrka.hr/stranice/rijeka-krka/85.html>, ustupljeno: 25.10.2017.

- Jezidžić P. (2015): Hidrogeološke karakteristike rijeke Krke. Seminarski rad. Prirodoslovno matematički fakultet. Zagreb.
- Jeziarska B., Witeska M. (2006): The metal uptake and accumulation in fish living in pollutes waters. U: Twardowska I. i sur. (Ur.) Soil and water pollution monitoring, protection and remediation. Springer Netherlands.
- Jukić D. (2006): Plan upravljanja slivom rijeke Krke. Hrvatske vode. Split.
- Klemetsen A., Amundsen P. - A., Dempson J. B., Jonsson B., Jonsson N., O'Connell M. F., Mortensen E. (2003): Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. Ecology of Freshwater Fish, **12**: 1-59.
- Kopecka - Pilarczyk J. (2010): The effect of pesticides and metals on acetylcholinesterase (AChE) in various tissues of blue mussel (*Mytilus trossulus* L.) in short-term in vivo exposures at different temperatures. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes **45**(4): 336-346
- Liang Y., Cheung R. Y. H., Wong M. H. (1998): Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: Bioaccumulation of trace metals in fish. Water Research, **33** (11): 2690-2700.
- de Lima D., Roque G. M., de Almeida E. A. (2013): In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). Marine Environmental Research, **91**: 45-51
- Magdić I., Parić M. (2015): Vertikalna varijabilnost nitratnog dušika i ostalih kemijskih značajki tla u agroekološkim uvjetima gorske i panonske Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet.
- Matonićkin Kepčija R. (2003): Program GLOBE- Priručnik za mjerenja. Istraživanje vode.
- Marnett J. L. (1999): Lipid peroxidation – DNA damage by mlondialdehyde. Mutation Research **424**: 83-95.
- Marnett J. L. (2000): Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis, **21**(3): 361-370.

- Mason C. (2002): *Biology of Freshwater pollution*. 4th Edition. Pearson Education Limited, Harlow, England.
- Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja (2003): *Strategija gospodarenja otpadom RH*. Zagreb.
- Ministarstvo zaštite okoliša i energetike (2016): *Nacrt prijedloga plana gospodarenja otpadom RH za razdoblje 2016.-2022. godine*.
- Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D. (2006): *Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske*. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council (1987): *Biological markers in environmental health research*. Environmental Health Perspective, **74**: 3-9.
- Pampanin D. M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C. (2005): *Susceptibility to oxidative stress of mussels (Mytilus galloprovincialis) in the Venice Lagoon (Italy)*. Marine Pollution Bulletin, **50**: 1548-1557.
- Pamplona R. (2008): *Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, **1777**(10): 1249-1262.
- Paulus W. (1993): *Microbicides for the Protection of Materials*. 1st Edition. Springer Netherlands.
- Perić J., Vukojević-Medvidović N., Nuić I. (2012): *Inženjerstvo otpadnih voda. Priručnik za laboratorijske vježbe*. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Zavod za inženjerstvo okoliša. Split.
- Ravera O. (1986): *Cadmium in freshwater ecosystems*. U: Mislin H. (Ur.): *Cadmium in the environment*. Birkhauser Verlag Basel.
- Rice E. W., Baird R. B., Eaton A. D., Clesceri L. S. (2012): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.



- Riley J. P., Chester R. (1971): *Introduction to Marine Chemistry*. Academic Press, London.
- Romeo M., Giamberini L. (2013): History of biomarkers. U: Amiard-Triquet C., Amiard J. -C., Rainbow P. S. (Ur.) *Ecological Biomarkers: Indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press, Boca Raton.
- Sofilić T. (2014): *Ekotoksikologija*. Metalurški fakultet, Sisak.
- Srebočan E., Strunjak-Perović I., Lasić D., Opačak A., Knežević D. (2014): Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske. Hrvatska agencija za hranu.
- Steenland K., Boffetta P. (2000): Lead and cancer in humans: Where are we now? *American Journal of Industrial Medicine*, **38**(3): 295-299.
- Štefan L., Tepšić T., Zaviđić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*, **43**: 84-93.
- Štrkalj A. (2014): *Onečišćenje i zaštita voda*. Metalurški fakultet, Sisak.
- Vasiljević R. (2010): *Arsen u podzemnoj vodi iz prirodnih izvora*. Hrvatske vode. Zagreb.
- Vlada republike Hrvatske (2013): *Uredba o standardu kakvoće voda (73/13, 151/14, 78/15 i 61/16)* Vlada republike Hrvatske.
- Walker C. (2014): *Ecotoxicology. Effects of Pollutants on the Natural Environment*. CRC Press, Boca Raton.
- World Health Organisation (WHO) (2009): *Potassium in drinking water. Guidelines for Drinking-water Quality*.

**ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 13.04.1993. u Čakovcu gdje sam provela svoje djetinjstvo, završila osnovnoškolsko obrazovanje u Osnovnoj školi Šenkovec i pohađala Gimnaziju Čakovec. Nakon gimnazije, 2012. godine sam upisala preddiplomski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te 2015. godine diplomski studij Ekologije i zaštite prirode, modul Kopnene vode. U okviru studija obavila sam stručnu praksu u Laboratoriju za alge, stručnu praksu u Laboratoriju za beskralješnjake te sam sudjelovala u manifestacijama Noći biologije. Aktivni sam član Udruge studenata biologije BIUS u okviru koje sam bila voditelj Zelenog kolektiva, glavni organizator i voditelj projekta "Mura-Drava 2016." te 2017. član Nadzornog odbora Udruge, a također sam sudjelovala i na projektima Papuk 2015. i Insula Tilagus 2017. Samostalno sam organizirala i vodila radionicu iz biologije za djecu u sklopu ljetne škole Knjižnice i čitaonice Šenkovec. Dodatno sam u Laboratoriju za ekologiju životinja na Prirodoslovno matematičkom fakultetu radila na izolaciji i determinaciji makrozoobentosa te sam sudjelovala u terenskom radu u okviru projekta „Urbana ekologija potoka grada Zagreba – pilot projekt" (HAZU) pod vodstvom doc. dr. sc. Mirele Sertić Perić. Istraživanje za diplomski rad provela sam u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Vlatke Filipović Marijić, a dio podataka iz provedenog istraživanja je predstavljen na „2. Simpoziju o biologiji slatkih voda“ 15.2.2017. na PMF-u u Zagrebu (objavljen sažetak: V. Filipović Marijić, M. Veseli, Z. Dragun, D. Ivanković, N. Krasnići, M. Erk (2017) Procjena kakvoće vode rijeke Krke praćenjem bioloških pokazatelja u potočne pastreve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) te će također biti predstavljen na radionici „Technology Critical Elements in ecosystem and human health“ u Estoniji 19.-20.4.2018. (prihvaćen sažetak: T. Mijošek, V. Filipović Marijić, Z. Dragun, D. Ivanković, N. Krasnići, M. Veseli, M. Erk (2018) Thallium bioaccumulation in different bioindicator organisms from the karst Krka River in Croatia). Na „2. Simpoziju o biologiji slatkih voda“ sudjelovala sam i kao član tehničkog odbora. Tijekom studiranja obavljala sam razne studentske poslove i volontirala sam u ZEU „Prijatelji životinja i prirode“, Čakovec.