

Procjena toksičnosti vode rijeke Save korištenjem rakušca *Gammarus fossarum* i rašljoticalca *Daphnia magna* te kemijskom karakterizacijom vode

Drnić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:721982>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Drnić

**Procjena toksičnosti vode rijeke Save korištenjem
rakušca *Gammarus fossarum* i rašljoticalca *Daphnia magna*
te kemijskom karakterizacijom vode**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju za Ekotoksikologiju na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Görana Klojučara i dr. sc. Olge Malev. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujem neposrednoj voditeljici rada dr. sc. Olgi Malev na pristupačnosti i strpljenju, pomoći u praktičnom dijelu rada te korisnim savjetima pri obradi i interpretaciji rezultata.

Hvala voditelju rada prof. dr. sc. Göranu Klobučaru na zanimljivoj predloženoj temi, ustupljenoj literaturi potrebnoj za izradu ovog rada te pomoći pri snimanju i analiziranju kretanja modelnih organizama.

Zahvalu dugujem i izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac i Martini Galeković s Botaničkog zavoda koje su mi omogućile izvođenje svih potrebnih mjerenja i uvijek bile na raspolaganju za sva moja pitanja i nedoumice.

Hvala i Mariu Lovriću za pomoć pri statističkoj analizi kretanja modelnih organizama.

Hvala mojim kolegicama i prijateljicama, posebno Ivani na konstantnom ohrabivanju te Moniki i Petri na brzim intervencijama kad je bilo najpotrebnije ☺.

Posebno zahvaljujem i svojim roditeljima na ogromnoj podršci i razumijevanju tijekom svih godina studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PROCJENA TOKSIČNOSTI VODE RIJEKE SAVE KORIŠTENJEM RAKUŠCA *Gammarus fossarum* I RAŠLJOTICALCA *Daphnia magna* TE KEMIJSKOM KARAKTERIZACIJOM VODE

Martina Drnić

Rooseveltove trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Kontinuirani industrijski i tehnološki napredak čovječanstva rezultira sve većim brojem različitih onečišćivala prisutnih u okolišu zbog čega raste potreba za monitoringom onečišćenja i utvrđivanjem eventualnih negativnih posljedica koje ono može prouzročiti. U ovom su radu korištena dva standardizirana testa u svrhu procjene kvalitete vode rijeke Save. Uzevši u obzir bitne uloge beskraljeznjaka u slatkovodnom okolišu, slatkovodni rakovi *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) i *Daphnia magna* (Straus, 1820) korišteni su u ovom istraživanju kao modelni organizmi zbog visoke osjetljivosti na onečišćenje vode, lakog rukovanja i mogućnosti praćenja promjena ponašanja. Također, biokemijski parametri (detoksikacijska aktivnost pomoću enzima glutation-S-transferaze (GST), oksidacijska oštećenja uz mjerenje sadržaja malondialdehida (MDA)) koji se na njima mogu analizirati dodatan su razlog izbora ovih modelnih organizama. Modelni su organizmi bili izloženi filtriranim uzorcima vode s pet lokacija za koje su utvrđeni različiti stupnjevi onečišćenja vode (Hrušćica > Rugvica > Jesenice > Lukavec > Jankomir). Prisutnost onečišćivala na ovim je postajama utvrđena visokoprotlačnom kemijskom analizom vode. Nakon izlaganja, testom učinkovitosti hranjenja utvrđena je smanjena stopa hranjenja, aktivnost GST bila je povećana, a sadržaj MDA smanjen u odnosu na kontrolu. Korištenje ekotoksikoloških testova, uz kemijsku analizu vode, omogućilo je detaljnu procjenu kvalitete vode rijeke Save i pružilo mogućnost razdvajanja postaja na temelju stupnja onečišćenja.

(97 stranica, 39 slika, 6 tablica, 185 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: procjena toksičnosti, kemijska karakterizacija vode, organska onečišćivala, biokemijski biomarkeri, kretanje životinja, *Gammarus fossarum*, *Daphnia magna*

Voditelj: prof. dr. sc. Göran Klobučar

Neposredni voditelj: dr. sc. Olga Malev

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

prof. dr. sc. Alan Moro

doc. dr. sc. Ivan Čanjevac

Rad prihvaćen: 6. lipnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

TOXICITY ASSESSMENT OF THE WATER FROM SAVA RIVER USING AMPHIPOD *Gammarus fossarum* AND CLADOCERAN *Daphnia magna* AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF WATER

Martina Drnić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Continuous industrial and technological development results in increasing number of different contaminants present in the environment. Due to the possible negative consequences that this numerous contaminants could induce, it is necessary to actively monitor such environmental contamination. Two standardized bioassays were used in this study to assess the water quality of the Sava River. Considering the important role of invertebrates in freshwater environments, freshwater crustaceans *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) and *Daphnia magna* (Straus, 1820) were used in this study as model organisms due to their high sensitivity to water contamination, simple handling and easy assessment of behavioral changes and changes in several biochemical parameters (detoxifying activity followed by enzyme glutathione-S-transferase (GST), oxidative damage by measurement of malondialdehyde (MDA) level) that can be measured on them. Model organisms have been exposed to filtered water samples from five locations where different levels of water contamination were established (Hrušćica > Rugvica > Jesenice > Lukavec > Jankomir). The presence of contaminants at these locations was determined by high-throughput chemical analysis of water. Post-exposure feeding test showed lower feeding rates, GST activity was increased and the level of MDA was decreased when compared to control. The use of ecotoxicological bioassays, combined with chemical analysis of water samples, has provided a detailed assessment of the water quality of the Sava River and offered the possibility for distinction of the locations based on the degree of water contamination.

(97 pages, 39 figures, 6 tables, 185 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: toxicity assessment, chemical characterisation of water, organic contaminants, biochemical biomarkers, animal locomotion, *Gammarus fossarum*, *Daphnia magna*

Supervisor: Göran Klobučar, PhD, Full Professor

Immediate supervisor: Olga Malev, PhD

Reviewers: Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor

Alan Moro, PhD, Full Professor

Ivan Čanjevac, PhD, Assistant Professor

Thesis accepted: June 6th 2019

POPIS KRATICA

BPA – bisfenol A

BSA – goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*)

CBBG – Coomassie Brilliant Blue G-250 (plavo bojilo)

CNDB – 1-kloro-2,4-dinitrobenzen

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EPA – Američka agencija za zaštitu okoliša (eng. *Environmental Protection Agency*)

GSH – glutation

GST – glutation-S-transferaza

HALMED – Agencija za lijekove i medicinske proizvode

LP – lipidna peroksidacija

MDA – malondialdehid

MS – masena spektrometrija

OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj

OO – organska onečišćivala

ORZO – onečišćivala od rastućeg značaja za okoliš (eng. *contaminants of emerging environmental concern*)

PBS – fosfatna puferirana otopina soli (eng. *phosphate-buffered saline*)

PEFT – test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja (eng. *post-exposure feeding test*)

PTFE – politetrafluoretilen

ROS – reaktivni oblici kisika (eng. *reactive oxygen species*)

TBA – tiobarbiturna kiselina

TCA – trikloroctena kiselina

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

UHPLC/QTOF/MS – eng. *ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight/mass spectrometry*

UV/VIS – ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Onečišćenje i ekotoksikologija.....	1
1.1.1 Onečišćivala od rastućeg značaja za okoliš.....	2
1.1.2 Organska onečišćivala u vodi.....	3
1.2. Glavne skupine organskih onečišćivala.....	5
1.2.1. Farmaceutski proizvodi.....	5
1.2.2. Pesticidi.....	6
1.2.3. Industrijske kemikalije.....	6
1.2.4. Hormoni.....	7
1.2.5. Spojevi koji nisu svrstani u prethodne skupine („Ostalo“)......	8
1.3. Monitoring okoliša i procjena toksičnosti.....	8
1.3.1. <i>In vivo</i> biotestovi.....	9
1.4. Modelni organizmi.....	10
1.4.1. <i>Gammarus fossarum</i> (Koch, 1836).....	11
1.4.2. <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820).....	12
1.5. Oksidacijski stres i oksidacijsko oštećenje.....	14
1.5.1. Radikali u biološkim sustavima.....	15
1.5.2. Antioksidacijski sustav.....	16
1.5.3. Biokemijski biomarkeri.....	17
1.5.3.1. Ukupni proteini.....	18
1.5.3.2. Glutation-S-transferaza.....	19
1.5.3.3. Lipidna peroksidacija.....	19
1.5.4. Promatranje ponašanja modelnih organizama i analiza kretanja.....	20
1.5.4.1. Računalni programi za praćenje kretanja.....	21
1.6. Područje istraživanja.....	21
1.6.1. Hidrogeografske osobine rijeke Save.....	21
1.7. Cilj rada.....	23
2. MATERIJALI I METODE.....	24
2.1. Područje uzorkovanja i priprema uzoraka.....	24
2.2. Kemijska karakterizacija vode.....	25
2.3. Standardizirani testovi.....	26

2.3.1. <i>Gammarus fossarum</i> : akutni test toksičnosti.....	26
2.3.1.1. Uzorkovanje rakušaca.....	26
2.3.1.2. Izlaganje.....	27
2.3.1.3. Snimanje i analiza kretanja.....	29
2.3.1.4. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja.....	31
2.3.1.5. Homogenizacija i mjerenje biokemijskih biomarkera.....	31
2.3.1.6. Ekstrakcija i određivanje sadržaja ukupnih proteina.....	33
2.3.1.7. Mjerenje aktivnosti glutation-S-transferaze.....	33
2.3.1.8. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	34
2.3.2. <i>Daphnia magna</i> : akutni imobilizacijski test.....	35
2.3.2.1. Uzgoj vodenbuha.....	35
2.3.2.2. Izlaganje.....	35
2.3.2.3. Snimanje i analiza kretanja.....	36
2.3.2.4. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja.....	37
2.4. Statistička obrada podataka.....	38
3. REZULTATI.....	40
3.1. Kemijska karakterizacija vode.....	40
3.2. <i>Gammarus fossarum</i> : akutni test toksičnosti.....	51
3.2.1. Analiza kretanja.....	51
3.2.1.1. Prosječna brzina – 24 h i 48 h.....	51
3.2.1.2. Prosječno ubrzanje – 24 h i 48 h.....	52
3.2.1.3. Stopa pokretljivosti – 24 h i 48 h.....	54
3.2.1.4. Ukupna prijeđena udaljenost – 24 h i 48 h.....	55
3.2.2. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja.....	56
3.2.3. Biokemijski biomarkeri.....	57
3.2.3.1. Ukupni proteini.....	59
3.2.3.2. Mjerenje aktivnosti glutation-S-transferaze.....	60
3.2.3.3. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	61
3.3. <i>Daphnia magna</i> : akutni imobilizacijski test.....	62
3.3.1. Imobilizacijski test.....	62
3.3.2. Analiza kretanja.....	63
3.3.2.1. Prosječna brzina – 24 h.....	63
3.3.2.2. Prosječno ubrzanje – 24 h.....	64
3.3.2.3. Stopa pokretljivosti – 24 h.....	65

3.3.2.4. Ukupna prijeđena udaljenosti – 24 h.....	66
3.3.3. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja.....	67
4. RASPRAVA.....	68
4.1. Kemijska karakterizacija vode.....	69
4.2. Ponašanje, kretanje i hranjenje životinja.....	75
4.3. Biokemijski biomarkeri.....	79
5. ZAKLJUČAK.....	82
6. LITERATURA.....	83
ŽIVOTOPIS.....	98

1. UVOD

1.1. Onečišćenje i ekotoksikologija

Onečišćenje podrazumijeva prisutnost strane kemijske tvari (onečišćivala) ili energije u okolišu u koncentraciji/količini koja u kraćem vremenskom razdoblju ne uzrokuje izravnu štetu za zdravlje ljudi ili drugih živih organizama. S druge strane, zagađenje je unošenje neke strane kemijske tvari ili energije (radioaktivnost, buka, toplina) u postojanom obliku u okoliš, u koncentraciji ili količini koja uzrokuje izravnu štetu za okoliš, žive organizme ili ljudsko zdravlje. Zagađenjem se smatraju dugotrajni štetni i često nepovratni utjecaji na okoliš i njegove materijalne ili estetske vrijednosti (Chapman, 2007).

Velike količine onečišćivala, iz otpada nastalog putem industrijskih i poljoprivrednih aktivnosti, ulaze u okoliš: zrak, tlo te površinske i podzemne vode (Radić i sur., 2010). Onečišćivala se proučavaju u svrhu otkrivanja njihovog utjecaja na žive organizme, s obzirom na njihovu koncentraciju, postojanost, vrijeme zadržavanja u okolišu i trajanje izloženosti organizama njihovom djelovanju. Utjecaj kemikalija može biti izravan, ali i neizravan zbog složenih interakcija (Hollert i Keiter, 2015) i hranidbenih mreža na višim razinama biološke organizacije (Babić i sur., 2017).

Istraživanje utjecaja pojedinih spojeva na okoliš i zdravlje organizama u njemu, a neposredno i na čovjekovo zdravlje, predmetom je ekotoksikologije. Ekotoksikologija je interdisciplinarna znanost o okolišu koja se bavi interakcijama između kemikalija prisutnih u okolišu i živog svijeta, usredotočujući se na štetne učinke koji se javljaju na različitim razinama biološke organizacije. Razvila se iz tri različite discipline: toksikologije, primijenjene ekologije i kemije okoliša (Preston, 2002).

Ljudske aktivnosti (industrija, poljoprivreda, urbanizacija) u okolišu posljedično rezultiraju onečišćenjem. Toksični spojevi ulaze u interakciju sa živim i neživim dijelovima ekosustava, utječu na zdravlje i preživljavanje organizama te na normalno funkcioniranje biocenoza. Izravnim ispuštanjem velikih količina anorganskih i organskih tvari u okoliš, putem padalina ili ispiranjem poljoprivrednih površina, većina otpadnih tvari antropogenog porijekla dopire u vodena tijela. Vodeni okoliš djeluje kao konačni primatelj glavine onečišćenja pa je zbog toga posebno ugrožen (Štambuk, 2011). Čak i kad onečišćenje ne ulazi izravno u vodeni okoliš, neizravno može pristići putem tla ili zraka, a i oborine mogu ispirati dio prisutnih onečišćivala. Ako je tlo propusno, s vremenom utjecaj onečišćenja pristiže i do

podzemnih voda. Zbog toga, onečišćenje voda predstavlja jedan od najkritičnijih problema današnjice, posebno jer postoji mogućnost ugrožavanja izvora pitke vode. Ciklus vode u okolišu također igra bitnu ulogu u širenju onečišćenja. Onečišćena voda isparava i zračnim se masama prenosi na druga područja te oborinama dopijeva na nova i dotad nezagađena područja. Okoliš je zaokružena cjelina i sve treba uzeti u obzir kada se planira ispuštanje štetnih tvari u njega (Sparling, 2016).

Izvori ulaska organskih onečišćivala (OO) mogu biti točkasti i difuzni. Točkasti se izvor može točno odrediti i kvantificirati. Primjer točkastih izvora su oni izvori koji ispuštaju velike količine otpada u okoliš na jednom mjestu kao što su pojedinačni industrijski kompleksi, postrojenja i bolnice. S obzirom da se točkasti izvori mogu točno definirati, možemo ih bolje pratiti od difuznih. Difuzni su izvori raspršeni u prostoru, a neki od primjera su korištenje pesticida u poljoprivredi ili otpadne vode domaćinstava. Oni ne ispuštaju velike količine otpada na jednom mjestu pa predstavljaju i manju opasnost jer dolazi do razrjeđenja i nema vrlo visokih koncentracija u okolišu. Neki od glavnih puteva ulaska otpada u okoliš su otpadne komunalne vode, odlagališta otpada i procjedne vode, poljoprivredni, bolnički, industrijski te kućanski otpad (Li, 2014).

1.1.1. Onečišćivala od rastućeg značaja za okoliš

S pojavom sve naprednijih analitičkih metoda, danas se otkrivaju kemikalije koje prije nisu bile detektirane ili su prethodno bile prisutne u daleko manjim koncentracijama (ispod razine detekcije). Ove kemikalije poznate su kao onečišćivala od rastućeg značaja za okoliš (eng. *contaminants of emerging environmental concern*) (ORZO), a potiču zabrinutost jer rizik koji predstavljaju za zdravlje ljudi i okoliša još nije u potpunosti definiran (Water Quality Association, URL 7). To su kemikalije koje su u tragovima otkrivene u globalnim zalihama pitke vode, a uključuju lijekove, proizvode za osobnu njegu (sapune, kozmetičke proizvode, mirise i dr.), pesticide te spojeve koji mijenjaju i oštećuju endokrini sustav (endokrini modulatori). Ta su onečišćivala sve prisutnija u vodi za piće, a napredak tehnologije i analitičkih uređaja tek je odnedavno omogućio njihovo otkrivanje i kvantificiranje (Scientific American, URL 4). Za većinu ORZO trenutno postoji vrlo malo dostupnih informacija o njihovom potencijalnom toksikološkom značenju u ekosustavima, a posebno o dugoročnom izlaganju i učincima na okoliš u niskim, subletalnim koncentracijama (Smital, 2008).

Potencijalna ORZO uključuju mnoge grupe spojeva kao što su pesticidi, lijekovi, hormoni, mirisi, plastifikatori, usporavala gorenja, nanočestice, perfluoroalkilni spojevi, klorirani parafini, siloksani te razni elementi u tragovima. Među najraširenijim organskim onečišćivalima (OO) nalaze se postojana organska zagađivala (eng. *persistent organic pollutants*, POP), kao što su poliklorirani bifenili (eng. *polychlorinated biphenyls*, PCB), heksaklorocikloheksani, klordan, toksafen te policiklički aromatski ugljikovodici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH). Svi navedeni spojevi predstavljaju opasnost za vodene ekosustave, posebno vodene organizme i ljude (Sauvé i Desrosiers, 2014). Detergenti, biocidi, gnojiva, radioaktivni materijali, teški metali i toplinska onečišćivala samo su neki od najvažnijih izvora onečišćenja (Sharma, 2005). Popis glavnih i najvažnijih onečišćivala koja dopijevaju u vodene ekosustave kroz različite izvore predstavljen je u Tablici 1.

Tablica 1. Glavne skupine onečišćivala vodenih ekosustava (Ibáñez i sur., 2008; Sharma, 2005).

Vrsta onečišćivala	Primjer
Organske molekule	Detergenti, ulja, pesticidi, farmaceutici
Biljni nutrijenti	Nitrati, fosfati
Teški metali	Hg, Cd, Pb, As, Mo itd.
Toplina	Voda koja se koristi za procese hlađenja npr. hlađenje reaktora
Suspendirane čestice	Čestice mulja, prašine, pijeska i sl.
Radioaktivne tvari	Radioaktivni otpad, radioaktivne čestice iz nuklearnih eksplozija

1.1.2. Organska onečišćivala u vodi

Globalni ljudski utjecaj na slatkovodne ekosustave dosegao je takve razmjere da oni danas gube biološku raznolikost većom brzinom od najugroženijih kopnenih staništa (Dudgeon i sur., 2006). U današnje vrijeme ubrzanog industrijskog i tehnološkog razvoja te nedovoljnog poznavanja štetnog utjecaja čovjeka na okoliš, broj proizvedenih kemikalija raste, a vodeni se sustavi sve više nekontrolirano onečišćuju i zagađuju. Na popisu Agencije

za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država (US EPA, eng. *United States Environmental Protection Agency*) navedeno je više od 85 000 kemijskih spojeva koji pripadaju Zakonu o kontroli toksičnih spojeva (Toxic Substances Control Act - TSCA popis) (Erickson, 2017). Svake godine se proizvede oko 1000 novih kemijskih spojeva koji najčešće završavaju u vodenom okolišu i te kemikalije predstavljaju potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi i životinja izazivajući širok raspon negativnih učinaka: teratogenost, neurotoksičnost i genotoksičnost, endokrine poremećaje i imunosupresiju (Hollert i Keiter, 2015). Da bi se neki spoj uopće smatrao značajnim onečišćivalom i imao značajan utjecaj na vodeni okoliš, mora zadovoljiti nekoliko uvjeta (Bayona i Albaiges, 2006): 1) proizvodnja u velikim količinama (kao primarnog proizvoda ili kao popratnog spoja u proizvodnji neke druge kemikalije) ili kontinuirano ispuštanje u okoliš, 2) otpornost na abiotičke i biotičke oblike razgradnje, 3) sklonost bioakumulaciji.

Površinske i otpadne vode složene su smjese koje mogu sadržavati različita onečišćivala različitog porijekla. Velike količine onečišćivala iz industrijskog i poljoprivrednog otpada onečišćuju zrak, tlo, ali i površinske i podzemne vode. S obzirom da je voda jedan od najvažnijih prirodnih resursa, vrlo je važno procijeniti štetne učinke spojeva kako bi se pratila kvaliteta vode i zaštitila biološka raznolikost vodenih okoliša. U Europskoj uniji (EU), državne agencije za vodu koje slijede politiku EU redovito provode praćenje kvalitete voda s ciljem kontrole i sprječavanja onečišćenja (Milačić i sur., 2017).

Vrlo je teško kvantificirati rizik povezan s onečišćivalima prisutnim u okolišu. Kvalifikacija i kvantifikacija onečišćivala pomoću kemijskih analiza može odrediti koncentracijske razine tvari prisutnih u istraživanom ekosustavu. No, ta se onečišćivala rijetko javljaju sama i obično se nalaze u složenim smjesama. Na taj način uzrokuju učinke koji se razlikuju od učinka pojedine kemikalije (Hollert i Keiter, 2015) stoga treba uzeti u obzir i njihova moguća sinergistička, aditivna ili antagonistička međudjelovanja. Također, štetni se spojevi pojavljuju u vrlo niskim, subletalnim koncentracijama što poprilično otežava njihovo pouzdano određivanje kemijskom analizom. Takve niske koncentracije onečišćivala u nekim slučajevima mogu izazvati promjene na molekularnoj i/ili staničnoj razini (DNA, bjelančevine, lipidi) (Sauvant i sur., 1997; Richter i sur., 2015). Štetni učinci ovise o koncentraciji, ali i o trajanju izlaganja pa tako mogu biti akutni, subkronični ili kronični. Spojevi prisutni u ekosustavu također se mogu akumulirati kroz hranidbeni lanac, što predstavlja rizik za različite trofičke razine, kao i za ljude kroz konzumaciju ribe i vode (Babić i sur., 2017). Zbog svega prethodno navedenog razvijeni su različiti ekotoksikološki

testovi koji primjenjuju različite modelne organizme. Biološki testovi koji koriste žive stanice ili organizme mogu dati općeniti ili rjeđe, specifični odgovor na djelovanje smjese onečišćivala prisutnih u niskim koncentracijama u uzorku, a bez prethodnih informacija o sastavu i svojstvima smjese dobivenih kemijskom analizom (Richter i sur., 2015).

1.2. Glavne skupine organskih onečišćivala

U zadnje se vrijeme sve više sintetiziraju i proizvode razni organski spojevi koji se koriste u industriji, poljoprivredi, medicini te proizvodima za osobnu njegu. S obzirom na brz rast industrije, postoji malo informacija o njihovom utjecaju na ekosustav i ljudsko zdravlje. Uz namjerno sintetizirane spojeve nastaju i njihovi transformacijski produkti koji dodatno povećavaju broj prisutnih organskih spojeva (Li, 2014; Pal i sur., 2010). Ovo je istraživanje bilo usmjereno na pet skupina organskih onečišćivala: farmaceutike, pesticide, industrijske kemikalije, hormone te „ostalo“.

1.2.1. Farmaceutski proizvodi

Farmaceutski proizvodi su kemijski spojevi koji se koriste u svrhu dijagnosticiranja, liječenja, ublažavanja ili sprječavanja bolesti ili drugih abnormalnih stanja (WHO, 2011). Proizvode se i koriste u velikim količinama, njihova upotreba i raznolikost raste iz godine u godinu (WHO, 2011), a u protekla dva desetljeća spominju se i kao ORZO. Budući da se kontinuirano poboljšavaju sposobnosti otkrivanja raznih onečišćivala, dokazana je raširena prisutnost ljudskih i/ili veterinarskih lijekova u površinskim vodama (Water Quality Association, URL 7), ali i u podzemnim vodama te pitkoj vodi kao rezultat proizvodnih procesa i nepravilnog odlaganja (Bound i Voulvoulis, 2004; Hernando i sur., 2006). Razlog zbog kojeg bi farmaceutici mogli biti zanimljivi u ekotoksikološkom kontekstu je taj da oni posjeduju sposobnost aktivacije specifičnog biološkog odgovora. Ovi spojevi često imaju slične fizikalno-kemijske karakteristike kao što su lipofilnost (sposobnost prolaska kroz stanične membrane) i postojanost (kako bi izbjegli neaktivnost prije nego izazovu učinak liječenja), a to znači da imaju potrebna svojstva za bioakumulaciju i izazivanje učinaka u neciljanim vodenim organizmima (Halling-Sørensen i sur., 1998).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, lijekovi mogu ući u okoliš na više načina od kojih je najčešći put iz otpadnih voda domaćinstava (kanalizacija) i uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (WHO, 1993). Do 90% oralnih lijekova prolazi nepromijenjeno kroz ljudsko tijelo jer se ne apsorbira u potpunosti te tako ulazi u otpadne vode prilikom

ekskrecije. Farmaceutski proizvodi također mogu nenamjerno doći u vodu tijekom proizvodnje, rukovanja, skladištenja i upotrebe ili se mogu namjerno odbaciti neiskorišteni (Scientific American, URL 4).

1.2.2. Pesticidi

Pesticidi su kemikalije koje se koriste za ubijanje, odbijanje ili kontroliranje rasta i/ili ponašanja štetnih bioloških organizama (JMPS Manual, 2016). Pesticidi se klasificiraju prema vrsti nametnika na koje djeluju, načinu i razdoblju djelovanja te prema sastavu. To mogu biti kemijske tvari, biološki agensi (npr. virusi ili bakterije) ili dezinficijensi (Saravi i Shokrzadeh, 2011). Ova raznolika skupina spojeva uključuje insekticide, herbicide i fungicide, koji su i uključeni u ovo istraživanje, ali i nematicide, akaricide, rodenticide te avicide (Laetz i sur., 2009). Za razliku od većine drugih kemikalija, pesticidi se namjerno ispuštaju u okoliš radi kontrole nepoželjnih organizama (JMPS Manual, 2016). Potrošnja pesticida kontinuirano raste, kako u broju kemikalija koje se koriste, tako i u količini raspršenoj na poljoprivrednim površinama (Carvalho, 2006). To su biološki aktivne tvari, vrlo postojane i imaju sposobnost bioakumulacije kroz hranidbeni lanac preko tla i vode (Preston, 2002), a ljudi su sve izloženiji pesticidima u namirnicama, vodi i zraku (Malev, 2012).

Danas, s važnom ulogom poljoprivrede u društvu, pesticidi se koriste u jako velikim količinama i značajno utječu na okoliš, posebno na vodene ekosustave gdje su toksični i za neciljane organizme. Predstavljaju jednu od najvažnijih skupina kemijskih stresora u okolišu. Pesticidi su sve prisutnija onečišćivala u okolišu, a ulaze u kopnene vode otjecanjem s poljoprivrednih površina i iz domaćinstava (Fochtman i sur., 2000; Sabra i Mehana, 2015).

1.2.3. Industrijske kemikalije

Industrijska emisija podrazumijeva ispuštanje ili istjecanje otpadnih tvari te ispuštanje energije (toplina, buka) iz industrijskih postrojenja u zrak, tlo ili vodu. Industrijske kemikalije su spojevi koji se koriste u industriji, a obuhvaćaju širok raspon kemikalija koje se koriste u različite svrhe: perfluoralkilne i polifluoralkilne tvari koje se koriste u kromiranju i vatrogasnim pjenama, kao repelenti za odbijanje vode, ulja i mrlja u tekstilu i koži te kao organski surfaktanti (površinski aktivne tvari) u različitim proizvodima (OEHHA, 2015; Ahrens i Bundschuh, 2014), bisfenol A (BPA) koristi se u proizvodnji plastike, polikarbonata i epoksi smola (Ulhaq i sur., 2013), benzotriazoli su sastavni dijelovi hidrauličkih kočionih tekućina, međuproizvodi za boje, fungicide i lijekove, dok se alkilfenol etoksilati primjenjuju

kao detergents, emulgatori i ovlaživači (Seeland i sur., 2012; Soares i sur., 2008). Nonilfenol i oktilfenol glavni su metaboliti koji nastaju anaerobnom razgradnjom alkilfenol etoksilata, a koriste se kao neionski surfaktanti u kemijskim sredstvima za čišćenje i dezinfekciju te u industriji papira i tekstila. Svi su ti spojevi široko zastupljeni jer se koriste u proizvodnji deterdženata i PET ambalaže, a većina je vrlo stabilna u okolišu i otporna na hidrolizu, fotolizu i biorazgradnju te se bioakumulira kroz hranidbeni lanac (npr. perfluorirani spojevi) (Bossi i sur., 2008). Mnogi od tih spojeva djeluju kao endokrini modulatori (Jensen i Leffers, 2008; Kortner i Arukwe, 2007), a neki od njih mogu prevaliti velike udaljenosti kroz atmosferu i vodu (Ahrens i Bundschuh, 2014).

1.2.4. Hormoni

Hormoni su kemijske signalne tvari koje se nakon specifičnog podražaja sintetiziraju u malim količinama i izlučuju iz endokrinih stanica i žlijezda. Tjelesnim tekućinama prenose se do drugih (ciljanih) stanica u tijelu i nadziru njihovu funkciju i reguliraju biokemijske procese. Hormoni djeluju uglavnom na metaboličke procese u tijelu. S obzirom na kemijsku građu, hormoni se mogu svrstati u tri glavne skupine: derivate aminokiselina, peptide i bjelančevine te steroidne hormone. Steroidni hormoni nastaju iz kolesterola, a s obzirom na funkcije koje obavljaju mogu se podijeliti na: glukokortikoide (reguliraju metabolizam hranjivih tvari i upotrebu energije), mineralokortikoide (reguliraju ravnotežu soli i vode), androgene (nadziru spolne funkcije u muškarca) te estrogene i progesteron (nadziru spolne funkcije u žene). Steroidni se hormoni razgrađuju uglavnom u jetri, a nakon pretvaranja u manje aktivne oblike izlučuju se mokraćom, stolicom ili putem žuči. Mnogi se hormoni i spojevi s hormonskom aktivnošću danas sintetiziraju laboratorijski, što znatno povećava mogućnost njihove terapijske primjene. Pod pojmom "sintetički hormoni" najčešće se podrazumijevaju izmijenjeni hormoni, tj. hormonski analozi koji se uglavnom koriste u klasičnoj nadomjesnoj hormonskoj terapiji ili hormonskoj kontracepciji.

Hormoni koji su detektirani u kopnenim vodama često se analiziraju i proučavaju zajedno sa sintetskim steroidima. Prisutnost hormona u otpadnim vodama prvenstveno se objašnjava primjenom u humanoj terapiji, a kao produkti metabolizma i ekskrecije, hormoni u najvećoj mjeri završavaju u vodenom okolišu putem komunalnih otpadnih voda. Zbog svoje lipofilne prirode, adsorbiraju se na čestice u vodi i brzo se uklapaju u sediment (Writer i sur., 1995), a problem predstavlja i mogućnost bioakumulacije, biomagnifikacije i kretanje kroz prehrambeni lanac (Magi i sur., 2010). Prisutnost steroidnih hormona u vodenom okolišu

predstavlja veliki problem jer su to spojevi koji snažno utječu na endokrini sustav i mogu ometati funkciju hormona u tijelu te izazvati niz funkcionalnih poremećaja kod čovjeka i životinja, kao što su smanjene reproduktivne sposobnosti te usporen rast i razvoja organizma (Barreiros i sur., 2016). Kao rezultat intenzivnog onečišćenja vodenog okoliša, steroidni hormoni su zabilježeni u površinskim i podzemnim vodama (Al-Odaini i sur., 2010; Gorga i sur., 2015), sedimentima (Gorga i sur., 2015) pa čak i u vodi za piće (Magi i sur., 2010; Vulliet i sur., 2011). Prema nekim istraživanjima, koncentracije estrogenih hormona u otpadnim vodama često su daleko iznad praga dozvoljenih koncentracija (Sauvé i Desrosiers, 2014).

1.2.5. Spojevi koji nisu svrstani u prethodne skupine („Ostalo“)

Kemikalije kao što su acesulfam, koji se koristi kao sladilo, oktinoksat – spoj organskog UV filtra, iopromid – neionski jodirani kontrastni agens i metaboliti, kao što su 2-NP-AOZ, 4-acetilaminoantipirin, 4-formilaminoantipirin i N-desmetilklozapin uključeni su u posebnu skupinu pod nazivom "ostalo" jer po djelovanju i korištenju ne pripadaju u prethodno navedene skupine.

1.3. Monitoring okoliša i procjena toksičnosti

Zbog sve većeg broja onečišćivala razvijaju se nove analitičke tehnologije i metodologije kojima se bolje otkrivaju štetne tvari i procjenjuje njihov negativan utjecaj na okoliš (Sparling, 2016). Kemijske i fizikalne analize same po sebi nisu dovoljne za otkrivanje djelovanja svih potencijalno toksičnih tvari u vodi. One obično ne uključuju interakcije između pojedinih kemikalija, a mogu odrediti samo prisutnost i koncentraciju pojedinog onečišćivala u mediju. Primjenom bioloških analiza na modelnim organizmima moguće je ukazati na potencijalni toksični učinak uzrokovan djelovanjem smjesa onečišćivala. Potrebno je koristiti više bioloških metoda s različitim vrstama/porodicama organizama jer je vrlo vjerojatno da imaju različite odgovore i osjetljivost na pojedine kemikalije ili njihove smjese. Na taj način dobivene podatke možemo interpretirati kao informacije o cjelovitom stanju vodenog ekosustava (Mankiewicz-Boczek i sur., 2008). Praćenje stanja okoliša (trajno motrenje – monitoring) podrazumijeva niz aktivnosti koje uključuju uzorkovanje unaprijed određenom dinamikom, ispitivanje i sustavno mjerenje te praćenje prirodnih i drugih pojava u okolišu u svrhu zaštite. Biološki su sustavi pogođeni djelovanjem toksikanata i stoga pružaju detaljniju informaciju o učinku sveukupnog onečišćenja od samih kemijskih analiza (Jha, 2004) pa je razvoj detekcije oštećenja ekoloških sustava analizom biološke komponente od

posebnog značaja u otkrivanju posljedica onečišćenja. Takva temeljita analiza važna je kako bi se osigurao dobar ekološki i kemijski status vode prema zahtjevima Okvirne direktive o vodama Europske unije 2000/60/EC (Mankiewicz-Boczek i sur., 2008). U Republici Hrvatskoj se sustavno motri stanje voda na oko 450 mjernih postaja za površinske i oko 700 mjernih postaja za podzemne vode. Standardi za određivanje kakvoće površinskih i podzemnih voda propisani su Uredbom o standardu kakvoće voda (NN br. 73/13) temeljenom na Zakonu o vodama (NN br. 153/09, 130/11, 56/13) koja se primijenjuje od 2011. godine (Sofilić, 2014).

Za pravilnu i detaljnu procjenu toksičnosti neke kemikalije potrebno je definirati toksični učinak koji se analizira i korelaciju doza-odgovor, razjasniti mehanizme djelovanja i odrediti toksikodinamiku kemikalije. Osim detaljnih toksikoloških ispitivanja jedne kemikalije, javlja se potreba za opsežnim ispitivanjem zajedničkog toksičnog djelovanja nekoliko stotina kemikalija. Dostupnost spregnutih analitičkih tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (HPLC-MS) u suvremenim istraživanjima dovela je do revolucije analitičkih metoda za analizu organskih molekula poput farmaceutski aktivnih spojeva, veterinarskih lijekova i pesticida (Kuster i sur., 2006). Suvremena HPLC-MS analitička tehnologija ima izvrsnu osjetljivost i omogućuje razvoj metoda koje istovremeno analiziraju veliki broj kemikalija u različitim uzorcima s vrlo visokom učinkovitošću (Alder i sur., 2006).

1.3.1. *In vivo* biotestovi

Razumijevanje djelovanja toksičnih tvari i odgovora organizama na njih ima veliku ekološku važnost i gotovo je nemoguće potpuno eliminirati upotrebu modelnih organizama u ekotoksikološkim istraživanjima. Za bolje vrednovanje učinka na cijeli organizam koriste se standardizirani *in vivo* testovi s vrstama iz različitih trofičkih razina (bakterije, alge, beskralježnjaci). Korištenje standardiziranih protokola u laboratorijskim pokusima je poželjno jer se osiguravaju ponovljivi i usporedivi podaci. Ovi biološki testovi mjere učinke na parametre kao što su stopa rasta, smrtnosti i reprodukcije te aktivnost hranjenja, a uključuju i učinke temeljene na specifičnim biokemijskim biomarkerima (Malev, 2012).

1.4. Modelni organizmi

Osjetljivost modelnog organizma na toksične spojeve složen je problem jer uključuje vrstu modelnog organizma, vrstu onečišćivala, uvjete u okolišu, metode ispitivanja, životni stadij modelnog organizma te mnoge druge čimbenike (Tuikka i sur., 2011). Kako bi se što bolje procijenila toksičnost vode potreban je veći broj biotestova s više jedinki i s više različitih vrsta organizama zbog intraspecijske i interspecijske varijabilnosti (Silva i sur., 2009), a i različiti toksikanti imaju različito djelovanje.

Većina ekotoksikoloških testova na modelnim organizmima ima višestruke prednosti. Ti su testovi osjetljivi, brzi, ponovljivi i zahtijevaju relativno male količine uzoraka. Sve ih to čini prikladnim za ispitivanje većeg broja uzoraka. Također, vrlo su korisni jer mogu integrirati toksičan učinak onečišćivala i omogućiti detaljniju procjenu mogućih negativnih učinaka smjesa toksičnih tvari u okolišu (Källqvist i sur., 2008).

Beskralježnjaci se često koriste u istraživanjima. Člankonošci su vrlo dobri modelni organizmi za proučavanje osnovnih mehanizama koji se javljaju u promijenjenim fiziološkim stanjima. Rakovi, kao i kukci, pripadaju člankonošcima i zbog te veze predstavljaju pogodne neciljane skupine za istraživanje npr. utjecaja pesticida (Strausfeld, 1998). Člankonošci su sastavni dio slatkovodnih ekosustava te su često izloženi onečišćenju (Dudgeon i sur., 2006). Rakovi su posebno prikladni za biomonitoring vodenih staništa zbog široke rasprostranjenosti te osjetljivosti na antropogene spojeve u vodenim tijelima koje nastanjuju (Fernandez-Alba i sur., 2002). Osim toga, lako se prikupljaju i manje migriraju od riba.

U ovom su radu, za procjenu toksičnosti rijeke Save, korištene dvije vrste slatkovodnih rakova: rakušci vrste *Gammarus fossarum* i rašljoticalci vrste *Daphnia magna*. Poznato je da su ove vrste osjetljive na širok raspon kemijskih stresora. Rakušci se, zajedno s rašljoticalcima, svrstavaju među najosjetljivije vrste vodenih beskralježnjaka (von der Ohe i Liess, 2004).

1.4.1. *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) - slatkovodni rakušac splavar

Taksonomija: koljeno Arthropoda (člankonošci), potkoljeno Crustacea (rakovi), razred Malacostraca (viši rakovi), red Amphipoda (rakušci), porodica Gammaridae

Rakušci (Slika 1) su jedna od najrazličitijih i najrasprostranjenijih skupina morskih i slatkovodnih viših rakova. Zbog njihove raznolikosti nazivaju se "morski kukci", a ime reda dobili su zbog različitih vrsta nogu koje posjeduju. Tijelo rakušca iz porodice Gammaridae je bočno spljošteno, bez oklopa, građeno od 20 kolutića i prekrivano hitin-proteinskom kutikulom. Dužina tijela odrasle jedinke iznosi 4 – 20 mm. Smatra se da je ključni čimbenik koji određuje duljinu tijela odrasle jedinke količina otopljenog kisika u vodi (Glazier, 2009). Razdvojena su spola, a mužjaci su veći od ženki. Za razliku od većine rakova, nemaju stadij ličinke i juvenilne jedinke slične odraslim. Na glavi imaju dva para ticala; prva ticala su duža od drugih i kod mužjaka su duža nego kod ženki. Imaju sedam pari nogu za hodanje, a na osnovnim člancima nogu za hodanje nalaze se škrge. Često drugi i treći par nogu, tzv. gnatomodi, služe za prihvaćanje plijena ili ženke pri parenju, a ostale su noge hodalice (pereiopodi). Na zatku se još nalaze i tri para pleopoda tj. noge za veslanje i tri para uropoda koji služe za skakanje (Habdija i sur., 2011). Vrlo su pokretljivi, plivaju u skokovima opružanjem i savijanjem zatka i okrenuti na bok. Nastanjuje čiste kontinentalne planinske i subplaninske površinske vode (izvore, potoke, rijeke i jezera) s brzim strujanjem i dovoljno kisika. Obično su rašireni uz obalu, na zaklonjenim mjestima ispod kamenja, u velikim i brojnim skupinama. Kad se u vodotoku nagomila velika količina listinca s okolnog područja, pronalaze zaklon u njemu. Rakušci predstavljaju ključnu vrstu u vodenim ekosustavima jer imaju važnu ulogu u kruženju detritusa (Chaumot i sur., 2015). Usitnjivači su krupnog detritusa i hrane se organskom tvari u raspadanju, a bitna su karika i u hranidbenom lancu mnogih riba i vodozemaca (MacNeil i sur., 2000). Najveća porodica su Gammaridae, a najpoznatiji rod *Gammarus* čije su vrste rasprostranjene u moru i slatkim vodama, a u našim potocima, rijekama i jezerima najčešće se pojavljuju *G. fossarum* i *G. balcanicus* (Habdija i sur., 2011; Glazier, 2009). Vrste iz roda *Gammarus* predstavljaju dominantne beskralježnjake u pogledu biomase slatkovodnih ekosustava (MacNeil i sur., 2000).

Rakušci su važna sastavnica slatkovodnih ekosustava i često se koriste u ekotoksikologiji i procjeni rizika slatkovodnih vodenih tijela. Akumulacija onečišćivala u rakušcima prepoznata je kao značajan alat u procjeni kvalitete vode i rizika za okoliš (Kunz i sur., 2010). Rakušci mogu biti uzorkovani tijekom cijele godine, a lako ih je prepoznati i odrediti,

rukovati s njima te ih održavati u laboratoriju. Sve prethodno navedene činjenice objašnjavaju zašto se rakušci često koriste u toksikološkim istraživanjima (Gómez-Canela i sur., 2016; Chaumot i sur., 2015; MacNeil i sur., 2000) i zašto je ovaj modelni organizam uključen i u ovaj rad.



Slika 1. Mužjak i ženka vrste *Gammarus fossarum* (Koch, 1836).

(<http://www.pest-advice.com/2012/01/gammarus-large-flea-shaped-bugs.html>)

1.4.2. *Daphnia magna* (Straus, 1820) - velika vodenbuha

Taksonomija: koljeno Arthropoda (člankonošci), potkoljeno Crustacea (rakovi), razred Brachiopoda (škrgonošci), red Cladocera (rašljoticalci), porodica Daphnidae (vodenbuhe)

Vodenbuhe (Slika 2) su sitni planktonski rakovi duljine oko 1 mm, a žive uglavnom u slatkim vodama. S ekotoksikološkog stajališta važne su jer su primarni potrošači i dominantna sastavnica slatkovodnog zooplanktona. Primitivno obilježje jest prisutnost homonomne kolutićavosti trupa, a evoluciju obilježava razvoj listastih nožica. Imaju dvodijelnu hitinsku ljušturicu (karapaks) s terminalnom bodljom, specifično nauplijevo oko te dva para ticala. Drugi par ticala je izražen i njima se pokreću trzajima, a prva ticala su jedva zamjetna. Zapravo i samo ime reda potječe od velikih rašljastih drugih ticala koja služe za veslanje. Prsa imaju mali broj kolutića pa je i broj tjelesnih privjesaka reduciran na pet pari pereopoda. Iza prsa se nastavlja postabdomen koji završava furkom odnosno parom kandžica

kojima životinja odstranjuje neželjene čestice iz karapaksa. Hrane se filtriranjem suspendiranih čestica i algama, a same su gotovo najvažnija hrana mladih riba (Habdija i sur., 2011). Vodenbuhe se razmnožavaju spolno i partenogenezom. One su ciklički partenogeni koji mogu proizvesti dvije vrste jaja, diploidna partenogena jaja i haploidna spolna jaja, kao odgovor na trenutne prilike u okolišu (Slika 3). Jaja se razvijaju u ležnom prostoru, a iz jaja izlazi ličinka nauplij. Određivanje spola je također ekološki kontrolirano; mužjaci se pojave kao odgovor na odgovarajuće prilike u okolišu (Harris i sur., 2011).

Rašljoticalci iz roda *Daphnia* ključni su pelagički filtratori u mnogim ribnjacima i jezerima. Popularni su modelni organizmi u raznim biološkim disciplinama, od ekologije do biomedicinskih znanosti. Ključne osobine koje čine ove organizme izvrsnim eksperimentalnim modelima su ciklički partenogenetski životni ciklus, osjetljivost te jednostavan uzgoj i rukovanje (Zhang i sur., 2016; Harris i sur., 2011). Zahvaljujući tim karakteristikama, broj publikacija koje se bave rodom *Daphnia* brzo raste (Oliveira i sur., 2015; de Castro i sur., 2014; Jansen i sur., 2011), a *Daphnia magna* prepoznata je kao izvrstan modelni organizam za proučavanje nepoznatih mehanizama djelovanja onečišćivala od rastućeg značaja za okoliš (LeBlanc i sur., 2000).



Slika 2. *Daphnia magna* (Straus, 1820).

(https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia_magna#/media/File:Daphnia_magna_asexual.jpg)



Slika 3. Razlika između partenogenetske i spolne ženke i jaja koja proizvode (prilagođeno iz Zhang i sur., 2016).

1.5. Oksidacijski stres i oksidacijsko oštećenje

Oksidacijski stres neizbježan je rezultat života u okolišu s kisikom. Aerobnim organizmima za život je potreban kisik, no njegova potrošnja uzrokuje stvaranje potencijalno opasnih reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) u koje ubrajamo slobodne radikale i neradikalne molekule koje mogu uzrokovati oštećenja stanica (Davies, 1995; Banerjee i sur., 2001). Slobodni radikali kisika neophodni su za fiziološke procese u aerobnim biološkim sustavima i njihova se proizvodnja stalno događa u živim stanicama (Halliwell i Gutteridge, 2007). Popis najčešćih reaktivnih vrsta kisika dan je u Tablici 2.

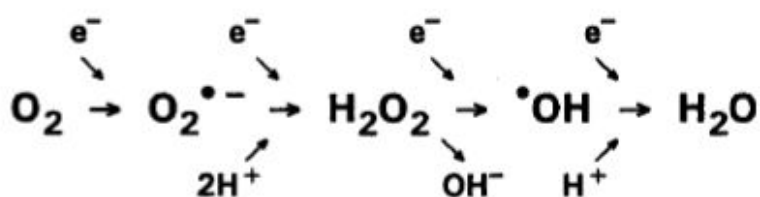
Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni s nesparenim elektronom pa zbog toga često stupaju u kemijske reakcije (Lushchak, 2011). ROS nastaju kao proizvodi metabolizma, a osim u biološkim procesima, u većim količinama mogu nastati pod utjecajem okolišnih čimbenika kao što je, primjerice, onečišćenje. Opasni su jer reagiraju s raznim molekulama u stanici, pokreću niz lančanih reakcija i stvaraju nove radikale koji tada postaju reaktivni (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Oksidacijski stres događa se kada je ravnoteža između nastajanja ROS i njihove neutralizacije pomoću antioksidacijskog sustava u stanicama narušena (Davies, 1995; Livingston, 2000, 2001). Tijekom metaboličkih procesa, mali dio (2 – 3%) slobodnih radikala izbjegne zaštitu koju pružaju antioksidacijski mehanizmi zbog čega dolazi do oksidacijskog oštećenja dijelova stanice (DNA, bjelančevina, lipida) pa je potrebno ukloniti nakupljene ROS iz stanice. Oksidacijski stres induciran toksikantima može izazvati lakše (povećana aktivnosti antioksidacijskih i detoksikacijskih enzima) i teže (oksidacija lipida, mutacije ili stanična smrt) učinke (Zama i sur., 2007).

1.5.1. Radikali u biološkim sustavima

Kisik redukcijom može proizvesti nekoliko različitih vrsta radikalnih (*) i neradikalnih štetnih molekula (Tablica 2). Redukcijom kisika nastaje prvi, superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$). Dodatnom redukcijom i dodavanjem vodikovih iona nastaju vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), hidroksidni ion (OH^-) te na kraju voda (H_2O) (Slika 4). Osim navedenih ROS, postoji još i singletni kisik (1O_2) koji ne nastaje redukcijom, već apsorpcijom elektromagnetske energije koja okrene spin jednog nesparenog elektrona kisika što ga čini nestabilnim (Davies, 1995).

Hidroksilni radikal ($\cdot OH$) najreaktivniji je oblik kisika. Odlikuje se niskom specifičnošću prema supstratu i kratkom vremenu poluživota. Najlakše oduzima elektrone susjednim molekulama te je važan pokretač lipidne peroksidacije (Lončar, 2015).



Slika 4. Redukcijski proces kisika (Davies, 1995).

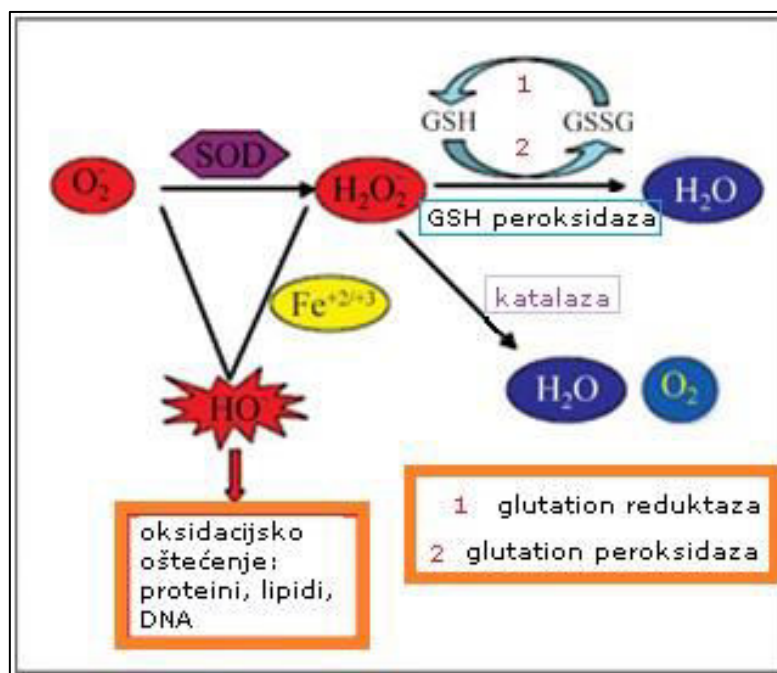
Tablica 2. Popis najčešćih reaktivnih vrsta kisika (* označava slobodne radikale).

superoksidni anion *	$O_2^{\cdot-}$
hidroksilni radikal *	$HO\cdot$
peroksilni radikal *	$ROO\cdot$
perhidroksilni radikal *	$HO_2\cdot$
alkoksilni radikal *	$RO\cdot$
vodikov peroksid	H_2O_2
ozon	O_3
singletni kisik	1O_2
hipoklorična kiselina	$HClO$

1.5.2. Antioksidacijski sustav

Prvu crtu obrane čini antioksidacijski sustav koji uklanja proizvedene ROS i slobodne radikale kako bi se izbjeglo oštećenje bitnih makromolekula (DNA, bjelančevina i lipida). Antioksidansi razgrađuju slobodne radikale i zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala te sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Generirane reaktivne vrste kisika potrebno je presresti ili razgraditi kako bi se izbjeglo oksidacijsko oštećenje na pojedinim makromolekulama (Slika 5), a za tu je svrhu obrane aktivan antioksidacijski sustav (Halliwell i Gutteridge, 2007). U osnovi postoje tri opća antioksidacijska obrambena sustava: (i) u vodi topljivi reducensi (npr. glutation, askorbat), (ii) lipofilni reducensi (npr. α -tokoferol, β -karoten) te (iii) enzimi (npr. katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza).

Niz antioksidacijskih enzima uklanja ROS u stanicama ili katalizira prisutne toksične spojeve i njihove metabolite (Davies, 1995). Povećanjem stresa povećava se broj radikala u stanicama pa tako i broj antioksidacijskih enzima koji mogu služiti kao biokemijski biomarkeri. Povećana aktivnost nekog od antioksidacijskih enzima upućuje na zaključak da je promatrani organizam u stanju oksidacijskog stresa (Valavanidis i sur., 2006).



Slika 5. Neravnoteža između proizvodnje pro-oksidansa i antioksidansa u stanici može dovesti do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kisika koje potencijalno dovode do većih staničnih oštećenja (prilagođeno iz Wakamatsu i sur., 2008).

1.5.3. Biokemijski biomarkeri

Biomarkere čine sve kvantitativne analize i mjerenja koja ukazuju na promjene u biološkom sustavu do kojih dolazi zbog izloženosti toksičnim spojevima. Biomarkeri pokazuju interakciju između biološkog sustava i potencijalno štetnog kemijskog, biološkog ili fizičkog djelovanja (WHO, 1993). Prilikom interpretacije podataka o toksičnom djelovanju uzorka dobivenih pomoću biomarkera u obzir se moraju uzeti i abiotički i biotički čimbenici odnosno utjecaji nevezani za onečišćenje. Oni mogu utjecati na biološke učinke, a kompleksnost bioloških sustava i njihova mogućnost kompenzacije stresa (Chapman, 2007) dodatno otežava tumačenje mjerenih biomarkera (Kleijnans i van Schooten, 2002).

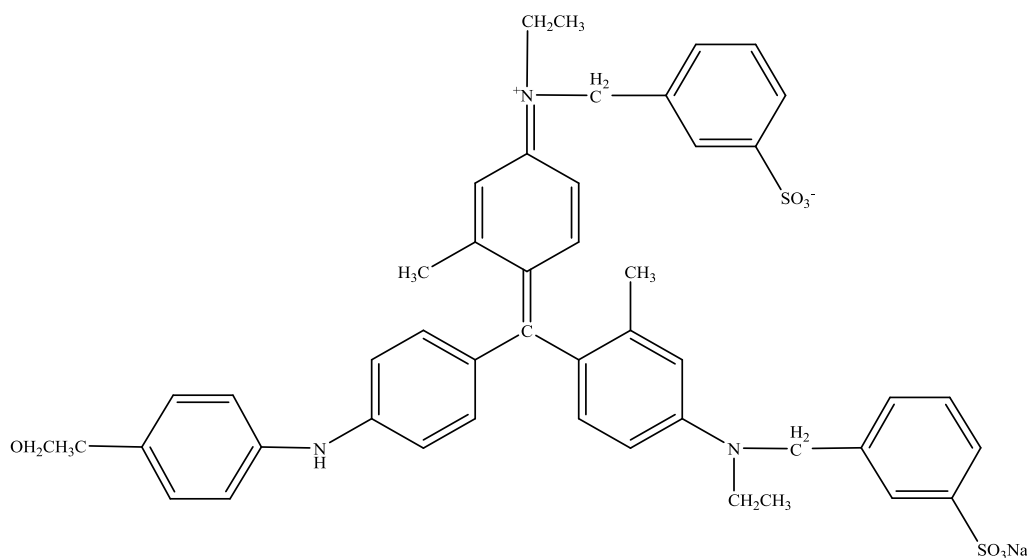
Korištenje biokemijskih biomarkera za razumijevanje mehanizama toksičnosti predstavlja koristan alat u istraživanju mogućih bioloških učinaka onečišćivala iz prirodnih i antropogenih izvora na živi svijet u vodenim ekosustavima (Sarkar, 2006). Svrha biomarkera je osigurati rano otkrivanje bioloških učinaka i upozoriti na promjene u ekosustavu. Promjene i odgovori na djelovanje toksičnih spojeva najprije se javljaju na nižim razinama biološke organizacije (molekularnim, biokemijskim, fiziološkim), a njihovim pravovremenim otkri-

vanjem moguće je spriječiti pojavljivanje štetnih učinaka na višim razinama biološke organizacije odnosno u populacijama i/ili zajednicama (Malev, 2012).

1.5.3.1. Ukupni proteini

Proteini su dugi lanci aminokiselina koji formiraju trodimenzionalne strukture. Imaju vrlo važnu strukturalnu i funkcionalnu ulogu na staničnoj razini i sastavni su dijelovi staničnih membrana (Anilkumar i Meenakshi, 2012). Bilo koja vrsta staničnog metabolizma koja se javlja u organizmu uključuje jedan ili više različitih proteina. Proteini su među najzastupljenijim biološkim makromolekulama i iznimno su „svestrani“ odnosno imaju višestruke uloge u metabolizmu proteina, aminokiselina i enzima (Harper i sur., 1978).

Mjerenje ukupnih proteina radi se prema Bradfordovoj metodi (1976) koja se temelji na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa, odnosno na reakciji Bradford reagensa Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) (Slika 6) i proteina prisutnih u uzorku koji formiraju kompleks. CBBG postoji u dvije različite boje, crvenoj i plavoj. Crveni kationski oblik se pretvara u plavi anionski nakon vezanja boje na protein, a vezanje boje na protein je vrlo brz proces (oko 5 minuta).



Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG)

Slika 6. Struktura CBBG bojila.

1.5.3.2. Glutation-S-transferaza

Glutation-S-transferaza (GST) je detoksikacijski enzim uključen u detoksikaciju mnogih toksičnih spojeva i ima važnu ulogu u zaštiti od oksidacijskog stresa. Spada u veliku skupinu enzima druge faze biotransformacije (detoksikacije) koji elektrofilne spojeve i njihove metabolite čine topljivijim u vodi i tako ih pripremaju za izbacivanje iz organizma (Banerjee i sur., 2001; Edwards i sur., 2000). Transferaze su skupina enzima koji kataliziraju pojedine tvari dodatkom reduciranog glutationa (GSH) elektrofilnim grupama i na taj način čine spoj topljivijim u vodi i lakšim za izlučivanje iz organizma. GST aktivnost obično je povećana u prisustvu toksikanata pa je potencijalni biomarker procesa detoksikacije. GST inducira vrlo veliki broj onečišćivala iako ju može aktivirati i samo oštećenje stanica (Edwards i sur., 2000).

1.5.3.3. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LP) ukazuje na postojanje oksidacijskog stresa u organizmu. Do nje dolazi zbog djelovanja toksikanata i stvaranja toksičnih oblika kisika u količini koja premašuje mogućnosti mehanizama za njihovo uklanjanje pa dolazi do oštećenja i destabilizacije membrana (Linden i sur., 2008). U normalnim biološkim uvjetima, molekula kisika neenzimatskom oksidacijom povremeno oduzima elektrone drugim molekulama što uzrokuje nastanak slobodnih radikala. Višestruko nezasićene masne kiseline u sastavu membranskih lipida često su meta stvorenih slobodnih radikala i posebno su osjetljive na LP. Unutarstanični i izvanstanični antioksidansi uklanjanjem ROS smanjuju mogućnost oksidacijskog oštećenja lipidnih molekula (Štefan i sur., 2007).

Proces LP sastoji se od tri dijela: inicijacije, propagacije i terminacije. U lipidnim sustavima peroksidacijski niz započinje aktivacijom kisika u stresnim uvjetima. ROS napadaju lipide i izdvajaju vodik iz metilenske skupine. Tako iz polinezasićenih masnih kiselina nastaju slobodni lipidni radikali koji, u drugom koraku, reagiraju s kisikom stvarajući štetne konjugirane diene, lipidne peroksilne radikale i lipidne hidroperoksidge. Nastali lipidni peroksil radikal je vrlo reaktivan i započinje lanac nepovoljnih reakcija oduzimajući vodik susjednoj molekuli lipida čineći novi lipidni radikal. Zadnji korak, završetak, događa se samo ako neki antioksidans donira vodik lipidnom peroksil radikalumu i time zaustavi proces otimanja vodika susjednom lipidu. LP može rezultirati velikim brojem različitih sekundarnih proizvoda, a jedan od glavni je malondialdehid (MDA) iz skupine aldehida (Alaya i sur., 2014; Štefan i sur., 2007).

MDA, koji nastaje kao završni proizvod procesa lipidne peroksidacije, može izazvati daljnje štetne učinke oštećujući DNA i bjelančevine te se koristi kao biomarker oksidacijskog stresa (Del Rio i sur., 2005). Mjerenjem količine MDA možemo zaključiti je li u stanici došlo do LP i jesu li lipidi oštećeni (Lykkesfeldt, 2007; Štefan i sur., 2007).

1.5.4. Promatranje ponašanja modelnih organizama i analiza kretanja

Ova kategorija uključuje procjenu promjena u ponašanju kao odgovor na izloženost toksikantima, a kao krajnje točke učinka kemikalija na ponašanje promatraju se razne aktivnosti kao što su kretanje i hranjenje (Hellou, 2011). Ponašanje se smatra korisnim alatom u ekotoksikologiji jer je jedno od prvih pokazatelja stresa (Pestana i sur., 2009). Kad god je to moguće, biokemijski biomarkeri trebaju se povezati s uočenim promjenama u ponašanju jer se na taj način daje integrirani odgovor na uvjete kojima je organizam izložen (Hellou, 2011). Potencijalna prednost ispitivanja ponašanja je u ranijem uočavanju promjena koje kemikalije mogu izazvati, a prije nego što se neki drugi učinci mogu javiti i otkriti na višim razinama biološke organizacije (Malev, 2012).

Kako se poboljšavaju ekotoksikološke metode u istraživanjima rizika za okoliš, ponašanje se sve češće koristi kao krajnja točka u ekotoksikologiji (Rodrigues i sur., 2016). Pokazalo se da je ponašanje relevantno i korisno u akutnoj i kroničnoj procjeni rizika za okoliš jer povezuje fiziološke funkcije s ekološkim procesima. Ponašanje je također vrlo osjetljivo na podražaje okoliša i izloženost kemikalijama (Dell'Omo, 2002). U posljednjih nekoliko godina sve se više koriste i promatraju promjene u ponašanju kao što je lokomotorna aktivnost (Wallace i Estephan, 2004; Mills i sur., 2006) ili brzina hranjenja (Maltby i sur., 2002) kao alat za ispitivanje toksičnosti uzoraka vode. Razvoj takvih testova ponašanja od velikog je značaja za ekotoksikologiju jer su ti testovi osjetljivi, brzi i jednostavni te omogućuju povezivanje toksičnih učinaka dobivenih na biokemijskoj/staničnoj razini (Wallace i Estephan, 2004). Pokretljivost organizma ekološki je značajan marker ponašanja jer je kretanje potrebno za pronalaženje hrane ili bijeg od predatora. Svaka kemikalija koja ometa pokretljivost vjerojatno će smanjiti sposobnost preživljavanja organizma i posljedično prouzročiti njegovu "ekološku smrt" (Scott i Sloman, 2004).

1.5.4.1. Računalni programi za praćenje kretanja

Analize kretanja koje se temelje na video snimanju postaju sve popularnije u ekotoksikološkim istraživanjima (Brodin i sur., 2014). Promjene u ponašanju modelnih organizama često se koriste kao osjetljivi markeri stresa koji su povezani s okolišnim čimbenicima. Karakteristike ponašanja poput aktivnosti, društvenosti ili agresije postaju bitne u istraživanju osobnosti životinja te studijama koje se usredotočuju na posljedice promjene okoline (Cote i sur., 2010).

Važna svojstva programa za praćenje kretanja životinja su algoritmi koji točno određuju položaj organizma u svakom trenutku te pružaju dodatnu pouzdanu analizu. Vrlo učinkovit algoritam za praćenje je Kalmanov filter, koji je također i najčešći algoritam koji se koristi za praćenje (eng. *tracking*). Glavna prednost Kalmanovog filtra je ta što omogućuje praćenje višestrukih objekata i ne zahtijeva nikakvo poznavanje oblika životinje. Neki od parametara aktivnosti koji se mogu mjeriti su prosječna brzina, ubrzanje te ukupna prijeđena udaljenost po jedinici vremena. Vizualni prikazi putanje kretanja mogu se koristiti kao mjera učinkovitosti pojedine jedinice u istraživanju novih područja te se mogu povezati sa značajkama kretanja povezanih s osjetljivošću na promjene (npr. onečišćenje) (Conrad i sur., 2011). Računalni program korišten u ovom istraživanju bio je ToxTrac® (Rodriquez i sur., 2017).

1.6. Područje istraživanja

1.6.1. Hidrogeografske osobine rijeke Save

Istraživanje je provedeno u svibnju 2018. godine na rijeci Savi, najvećoj i najbogatijoj pritoci rijeke Dunav. Rijeka Sava izvire u Alpama u Sloveniji i teče kroz Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu te Srbiju. Ukupna dužina iznosi 945,5 km, a 562 km rijeke protječe kroz Hrvatsku (Orešić, 2004). Porječje rijeke Save najveće je na području jugoistočne Europe, površine od približno 97.713 km² i čini više od 80% ukupne raspoložive slatke vode na tom području (Källquist i sur., 2008;ISRBC, 2010).

Tok rijeke Save dijeli se na gornji, srednji i donji. Gornji se tok nalazi u planinskom području, a u svom srednjem i donjem toku rijeka počinje krivudati i stvarati poplavna područja (Panonska nizina) (ISRBC, 2010). U donjem toku, nizvodno od Siska, rijeka postaje sporija, a Rugvica se uzima kao točka odakle Sava postaje ravničarska rijeka. Najveći dio

analiziranog dijela rijeke pripada srednjem toku, samo postaja Lukavec pripada donjem dijelu toka. Za opskrbu Save vodom u gornjem, planinsko-brdskom djelu porječja u Sloveniji važne su obilne oborine. U gornjem dijelu toka rijeka Sava ima snježno-kišni režim, a u srednjem i donjem dijelu toka režim prelazi u kišno-snježni (Orešić, 2004). Što se tiče geološke pozadine, dolina rijeke Save ispunjena je neogenskim i kvartarnim sedimentima. Debele naslage šljunka danas su iznimno važne u vodoopskrbi Zagreba i okolnih naselja. Podzemne vode koje se akumuliraju u tim pješćanim i šljunčanim vodonosnicima predstavljaju glavni i najvažniji izvor pitke vode (Brkić, 2017).

Rijeka Sava se ubraja u naše najonečišćenije rijeke jer prima puno organskih i anorganskih tvari iz raznih industrijskih postrojenja koja se nalaze uz nju (Orešić, 2004), a istraživanja Antonijević i sur. (2014) te Källqvist i sur. (2008) izvijestila su da postoji povećano opterećenje hranjivim tvarima, metalima i organskim spojevima poput pesticida, lijekova i proizvoda za osobnu njegu. Ti spojevi dovode do promjena režima protoka rijeke i onečišćenja sedimenta (Babić i sur., 2018). Mnogi od njih i u vrlo malim količinama imaju značajne štetne učinke na zdravlje ljudi i okoliša (Antonijević i sur., 2014; Källqvist i sur., 2008). Stanje se popravlja smanjenjem industrijskog onečišćenja i izgradnjom uređaja za pročišćavanje voda (Orešić, 2004). Procjena mogućih negativnih učinaka onečišćenja vrlo je važna budući da se opskrba pitkom vodom u porječju rijeke Save oslanja na resurse visokokvalitetnih podzemnih voda koje su pod utjecajem rijeke Save (Smital i Ahel, 2015).

Zbog smanjenja industrije i izgradnje pročišćivača vode, onečišćenje rijeke Save se smanjilo u zadnjih desetak godina. Glavni vodnogospodarski laboratorij Hrvatskih voda provodi monitoring površinskih voda (uključujući i rijeku Savu), koji uključuje uzorkovanje vode i fizikalno-kemijske, biološke i mikrobiološke analize. S članstvom Republike Hrvatske u EU, prihvaćena je i implementirana Okvirna direktiva o vodama kao i njen dodatak koji sadrži listu prioritarnih tvari u vodi za koje je potrebno podnijeti izvještaj kako bi se utvrdio napredak u smanjenju onečišćenja (Stipaničev, 2011).

1.7. Cilj rada

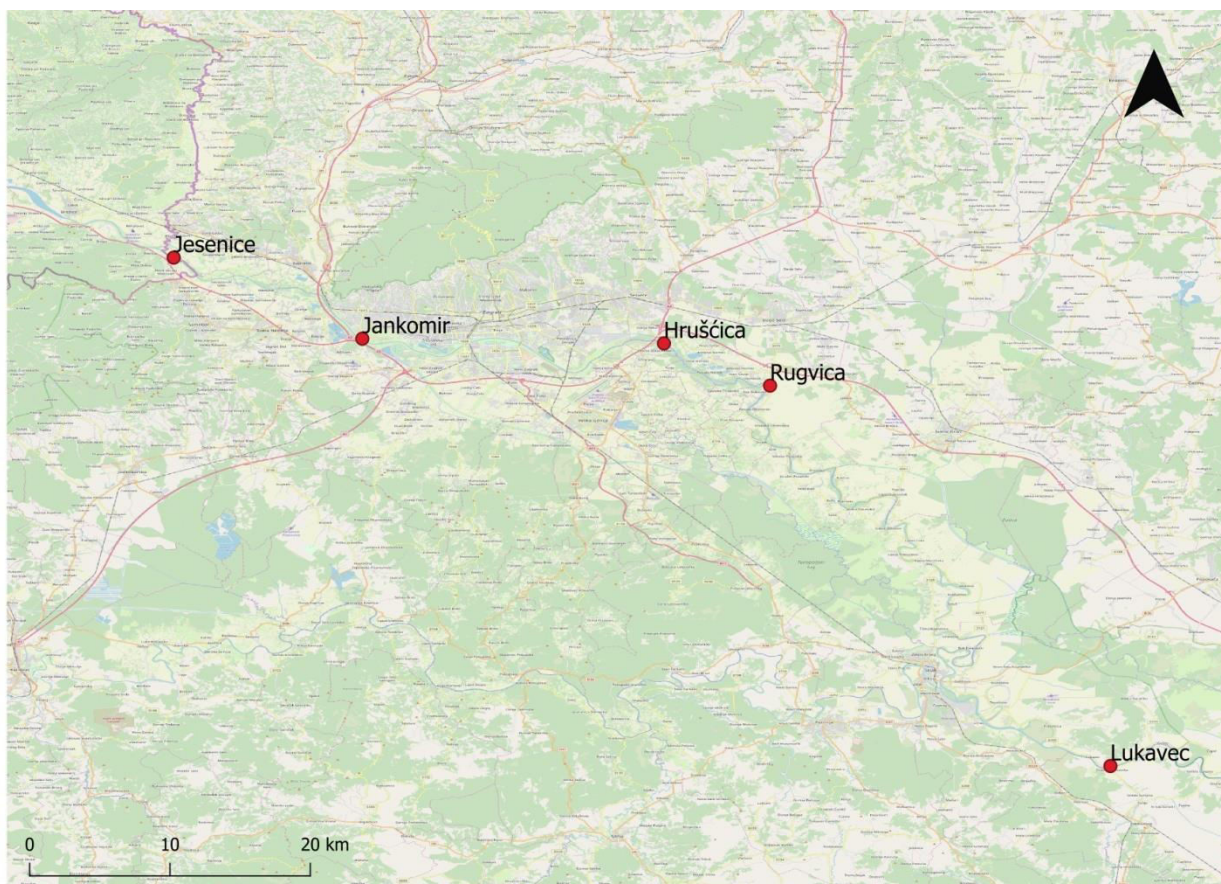
Za potrebe ovog istraživanja uzorci vode rijeke Save prikupljeni su na pet različitih postaja s potencijalno različitim stupnjem onečišćenja: Jesenice, Jankomir, Hrušćica, Rugvica i Lukavec. Cilj istraživanja bio je procijeniti kvalitetu i stupanj onečišćenja vode na svakom mjestu uzorkovanja korištenjem biotestova na modelnim organizmima te vidjeti kakav potencijalni utjecaj detektirani organski spojevi imaju na vodeni ekosustav.

Toksičnost je procijenjena pomoću bioloških testova na odabranim modelnim organizmima iz skupine člankonožaca, rakovima – *Gammarus fossarum*: akutni test toksičnosti (EPA, 1996) te *Daphnia magna*: akutni imobilizacijski test (OECD, 2004) uz opažanje promjena u kretanju i hranjenju koje se javljaju uslijed izlaganja uzorkovanoj vodi te uz mjerenje biokemijskih parametara tj. ukupnog sadržaja proteina i MDA te aktivnosti enzima GST. Procijenjena toksičnost putem izlaganja modelnih organizama uspoređena je s detaljnom kemijskom karakterizacijom uzorkovane vode sa svake postaje kako bi se pokušala utvrditi povezanost uočenih bioloških promjena s prisutnošću određenih spojeva u vodi rijeke Save.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje uzorkovanja i priprema uzoraka

Uzorci vode rijeke Save prikupljeni su u svibnju 2018. godine na pet postaja: Jesenice, Jankomir, Hrušćica, Rugvica i Lukavec (Slika 7). Postaja Jesenice smještena je otprilike 13 km uzvodno od Zagreba i predstavlja slabo do umjereno onečišćenu postaju. Postaja Jankomir nalazi se u predgrađu Zagreba, a postaja Hrušćica smještena je stotinjak metara nizvodno od glavnog odvodnog kanala uređaja za pročišćavanje Zagrebačkih otpadnih voda. Postaja Rugvica nalazi se oko 10 km nizvodno od ispusta otpadnih voda iz uređaja za pročišćavanje pa stoga prima komunalne i industrijske otpadne vode iz Zagreba. Postaja Lukavec nalazi se oko 10 km nizvodno od grada Siska, a prima komunalne vode te industrijske otpadne vode iz željezare, rafinerije nafte i pogona za proizvodnju pesticida (Babić i sur., 2018).



Slika 7. Karta postaja uzorkovanja vode. Napravljeno pomoću softvera QGIS.

Vrijeme sakupljanja uzoraka vode bilo je određeno prema vremenu prosječnog vodostaja rijeke Save, a postaje uzorkovanja odabrane su prema dostupnim podacima o intenzitetu onečišćenja rijeke Save (Babić i sur., 2018). Uzorci su sakupljeni u polikarbonatne boce od 1500 mL koje su prikladnije za uzorkovanje i skladištenje vode od staklenih boca, budući da se neki organski spojevi apsorbiraju na staklo (Stipaničev i sur., 2017). Prije postavljanja pojedinih pokusa uzorci vode su filtrirani kroz 0,2 μm politetrafluoretilen (PTFE) membranski filtar.

2.2. Kemijska karakterizacija vode

Kako bi se dobila detaljna procjena toksičnosti vode i odredila koncentracija prisutnih onečišćivala s odabranih lokacija rijeke Save, provedena je detaljna kemijska analiza. Kemijska karakterizacija uzoraka vode s istraživanih postaja provedena je u svibnju 2018. godine. Širok raspon organskih onečišćivala određen je pomoću tekućinske kromatografije spregnute spektrometrijom masa, UHPLC/QTOF/MS (eng. *ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight/mass spectrometry*). Odvajanje analita provedeno je na 1290 UHPLC sustavu (Agilent Technologies, USA) te su pojedini analiti detektirani i kvantificirani pomoću 6550 i-Funnel QTOF/LC-MS uređaja (Agilent Technologies, USA). Sve analize izvršene su u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda. Metoda se temeljila na direktnom ubrizgavanju 100 μL (200 μL za kisele pesticide) uzorka vode koji je filtriran kroz 0,2 μm PTFE filtar u UHPLC/QTOF/MS sustav. Ova je metoda korištena za određivanje sljedećih organskih spojeva: pesticida (karbamata, organofosfata, triazina, imidazolinona, kloroacetanilida, sulfoanilida, uree, benzimidazola, difenil etera, fenoksiocetnih i fenoksiopropionskih spojeva, dinitrofenola te neklasificiranih i rezidualnih spojeva), UV-blokatora, fluorosurfaktanata, hormona, farmaceutika te spojeva za osobnu njegu prema radu Stipaničev i sur. (2017).

2.3. Standardizirani testovi

2.3.1. *Gammarus fossarum*: akutni test toksičnosti

2.3.1.1. Uzorkovanje rakušaca

Rakušci su skupljeni u izvorskom djelu potoku Veliki potok na Medvedenici u svibnju 2018. godine. Potok iz kojeg su uzeti rakušci je mali potok koji se nalazi u Parku prirode Medvednica, gdje nema ljudskih aktivnosti pa se može smatrati nezagađenim, a obiluje rakušcima. U potok su postavljene zamke od čvrste mrežice (20 x 15 cm) i u njih je stavljeno suho lišće skupljeno uz obalu potoka (Slika 8). Zamke su uronjene u potok uz obalu na mirnijim i sporijim dijelovima toka gdje se rakušci inače zadržavaju. Zamke su podignute nakon tjedan dana. Rakušci su nekoliko dana držani u aeriranom staklenom akvariju u termostatiranom inkubatoru na 12 °C, u izvornoj vodi s potoka, kako bi se aklimatizirali na laboratorijske uvjete. Za istraživanje su se koristile odrasle jedinke koje su odvojene u staklene posude za izlaganje.



Slika 8. Postavljene zamke za uzorkovanje rakušaca.

2.3.1.2. Izlaganje

Prije izlaganja, svi su uzorci vode bili filtrirani (0,4 µm filtar). Također, u svim je uzorcima vode izmjerena temperatura vode, koncentracija i zasićenje kisika. Postaje su označene oznakama: P1-Jesenice, P2-Rugvica, P3-Hrušćica, P4-Lukavec, P5-Jankomir. Zbog nedostatka prostora i jednostavnije tehničke izvedbe, pokus je izveden s dva postavljanja i složen u dvije grupe s dvije kontrole: K1+P1+P4+P5 i K2+P2+P3. Voda koja je predstavljala kontrolu je voda uzorkovana s potoka Veliki potok. Svi uzorci vode čuvali su se u bocama u hladnjaku na temperaturi od 4 °C.

U testu akutne toksičnosti, prema smjernicama protokola (EPA, 1996), rakušci su bili izloženi nerazrijeđenim uzorcima vode u pet replika po postaji (Slika 9). U 300 mL vode sa svake od lokacija stavljeno je dvanaest jedinki. Ukupno je po postaji korišteno 1500 mL vode i šezdeset jedinki (N = 60). Kao kontrolni uzorak korištena je voda iz potoka uzorkovana istog dana kada su skupljeni i rakušci. Tri su replike od svake postaje bile korištene za mjerenje biokemijskih parametara, a dvije za praćenje kretanja i provođenja testa intenziteta hranjenja nakon izlaganja (eng. *post-exposure feeding test*, PEFT). Test izlaganja uzorkovanoj vodi trajao je 48 h; kratak akutni period izlaganja koji je dovoljan za poticanje i uočavanje potencijalnih promjena. Posude s uzorcima vode i rakušcima bile su pokrivene Parafilm® folijom (kako bi se smanjilo isparavanje vode) i aerirane, a čuvale su se u mraku u inkubatoru pri stalnoj temperaturi od 12 °C. U svim su se replikama nakon 24 h i 48 h promatrali parametri stope imobilizacije i smrtnosti, presvlačenje te promjene u izgledu i boji.



Slika 9. Izlaganje rakušaca.

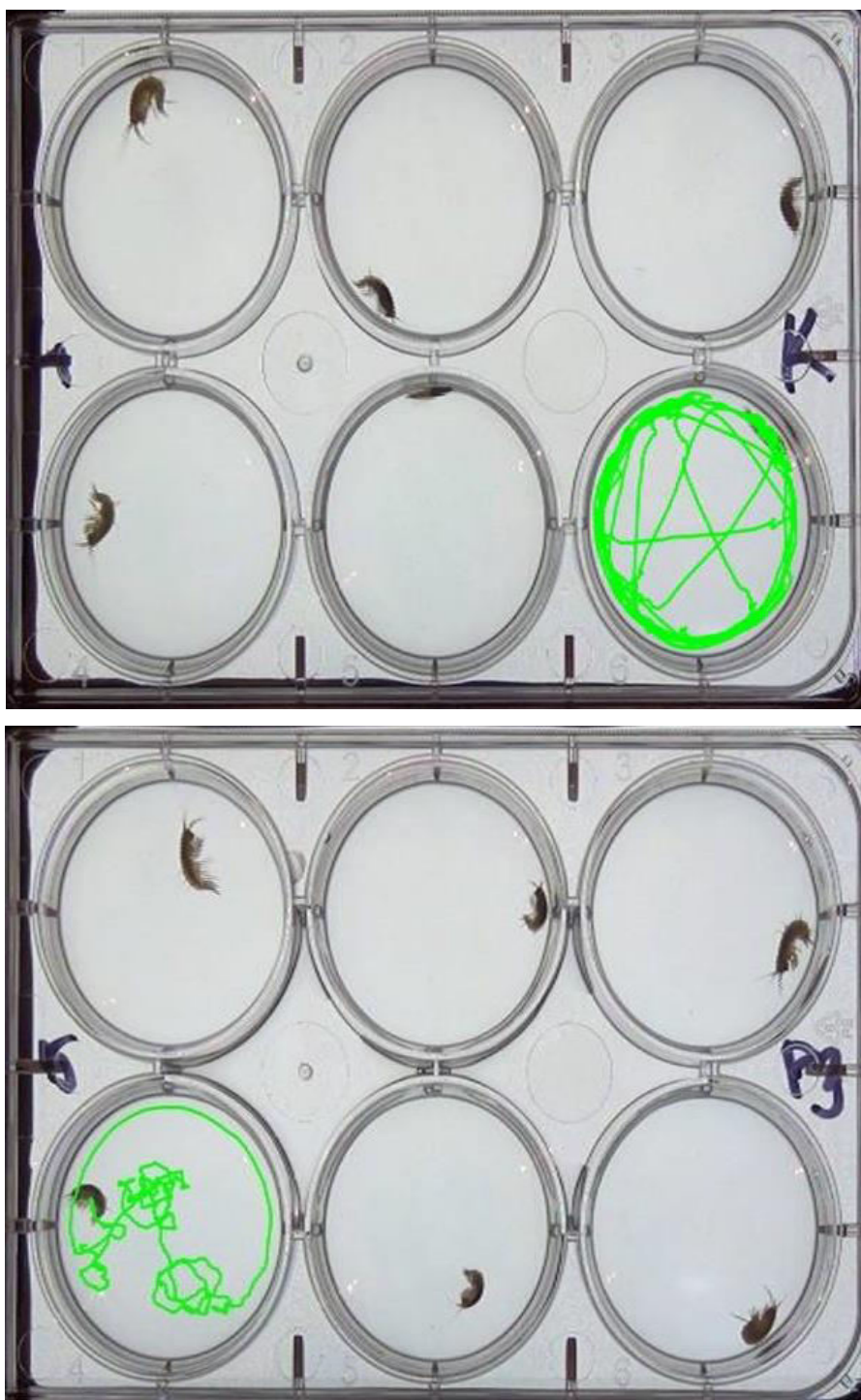
Nakon izlaganja uočene su i prebrojane presvučene, nepokretne ili mrtve jedinke. Žive odnosno mrtve jedinke određene su promatranjem odgovora na nježno protresanje i dodirivanje. Jedinke su smatrane mrtvima ako nije bilo nikakvog kretanja nakon tri dodira. Neaktivne/paralizirane životinje određene su uočavanjem samo pokreta disanja (Clesceri i sur., 1998). Presvučene jedinke brojane su na temelju prisutnosti cijelog svlaka u čaši.

2.3.1.3. Snimanje i analiza kretanja

Snimanje kretanja provodilo se nakon 24 h i 48 h na ukupno dvadeset četiri jedinke (dvije replike) po testiranom uzorku/lokaciji. Snimalo se u pločicama sa šest jažica (*6-well plate*) na način da je jedna jedinka bila stavljena u jednu jažicu u 1 mL vode (Slika 10). Snimanje je trajalo 10 minuta i nakon toga se analiziralo kretanje pomoću računalnog programa ToxTrac® (Slika 11), a praćeni parametri bili su prosječna brzina, prosječno ubrzanje, stopa pokretljivosti i ukupna prijeđena udaljenost.



Slika 10. Snimanje rakušaca u pločicama sa šest jažica.



Slika 11. Analiza kretanja rakušaca u jednoj jažici pomoću programa ToxTrac®
(gornja slika - kontrola 24 h; donja slika - Hrušćica 48 h).

2.3.1.4. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja

Nakon 48 h na istim je jedinkama proveden i test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja (eng. *post-exposure feeding test*, PEFT) s jajašcima račića artemija (*Artemia salina*) u trajanju od 3 h. Suha jajašca artemija dodana su u posudu s destiliranom vodom i promiješana nekoliko puta. Nakon pola sata stajanja u vodi, izdvojena su samo ona jajašca koja su bila na dnu posude. Ne koriste se jajašca koja plutaju na površini vode jer su nedostupna rakušcima pri hranjenju. U svaku su jažicu dodana jajašaca (N = 20) i nakon 3 h izbrojano je koliko je jajašaca ostalo u jažicama odnosno koliko ih je pojedeno.

2.3.1.5. Homogenizacija i mjerenje biokemijskih biomarkera

Po završetku testa izlaganja, testirani triplikati (po uzorku/lokaciji) korišteni su za analizu biokemijskih parametara prema odgovarajućim protokolima za izvođenje. Neki od važnih pokazatelja stresa izazvanog različitim toksikantima, koji ukazuju na moguće oksidacijsko oštećenje bjelančevina i lipida odnosno biomembrana, su ukupan sadržaj proteina i MDA te aktivnost detoksikacijskog enzima GST. Ukupno je korišteno trideset šest jedinki kojima je prije daljnje obrade (homogenizacije) određen spol te ukupna težina mokrog tkiva odnosno svježa masa jedinke (eng. *fresh weight*, FW). Životinja je prije vaganja bila osušena od viška vode između dva lista filter papira, a homogeniziralo se cijelo tijelo zbog male veličine. Rakušci su stavljani u Eppendorf epruvete te su naglo zamrznuti uranjanjem u tekući dušik na nekoliko sekundi.

Cijelo tijelo životinje homogenizirano je u puferu napravljenom prema protokolu (Cold Spring Harbot Protocols – <http://cshprotocols.cshlp.org>). Za homogenizaciju je korišten hladni kalij fosfatni (KP) pufer (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,4 + 3 mM EDTA). U Eppendorf epruvete sa smrznutim rakušcima dodane su kuglice za homogenizaciju. Uzorci su homogenizirani pomoću mlina (IST 400) (Slika 12), prvo 1 minutu bez pufera na 30 000 Hz, a zatim s dodatkom 400 μ L KP pufera još 30 sekundi. Homogenat je nakon toga centrifugiran u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) (Slika 13), 15 minuta na 20 000 okretaja u minuti (rpm) i na temperaturi od 4 °C. Svježe pripremljen bistri supernatant sakupljen je u čiste epruvete i čuvan na temperaturi od -80°C do mjerenja enzimatskih aktivnosti.



Slika 12. Homogenizator mlin IST 400.



Slika 13. Visokookretajna centrifuga Sigma 3K18.

2.3.1.6. Ekstrakcija i određivanje sadržaja ukupnih proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određena je Bradfordovom metodom (1976), a svi podaci koji se odnose na enzimatsku aktivnost su normalizirani na ukupnu vrijednost sadržaja proteina. Reakcijska smjesa sastojala se od 1 mL Bradfordovog reagensa i 50 μ L uzorka te su napravljene po dvije replike za svaku jedinku. Slijepu probu činio je Bradfordov reagens i KP pufer. Sadržaj svake epruvete promiješan je na tresilici i zatim ostavljen 10 minuta da se boja i proteini povežu i stvore kompleks. Apsorbancija plavo obojanog kompleksa mjerena je spektrofotometrom na 595 nm. Koncentracija proteina u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 mg/mL) goveđeg serumskog albumina (BSA, eng. *Bovine Serum Albumin*) koji je korišten kao standard.

2.3.1.7. Mjerenje aktivnosti glutation-S-transferaze

GST aktivnost određena je prema protokolu Habig i Jacoby (1981). Metoda se temelji na određivanju konjugiranog proizvoda dinitrofeniltioetera proizvedenog iz 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB), koji se koristi kao umjetni supstrat i reduciranog glutationa (GSH). Konjugacija se katalizira GST izoenzimima (Slika 14). Mjerenje je provedeno je na spektrofotometru (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena). Praćen je porast apsorbancije zbog redukcije supstrata CDNB pomoću SH-grupe od glutationa svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute pri valnoj duljini od 340 nm. Reakcijska smjesa (Tablica 3) bez uzorka korištena je kao slijepa proba. Vrijednosti su izražene kao nmol konjugata koji nastaje u minuti po mg proteina ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ za CDNB).

Tablica 3. Korišteni reagensi i reakcijska smjesa za mjerenje GST aktivnosti.

Korišteni reagensi:

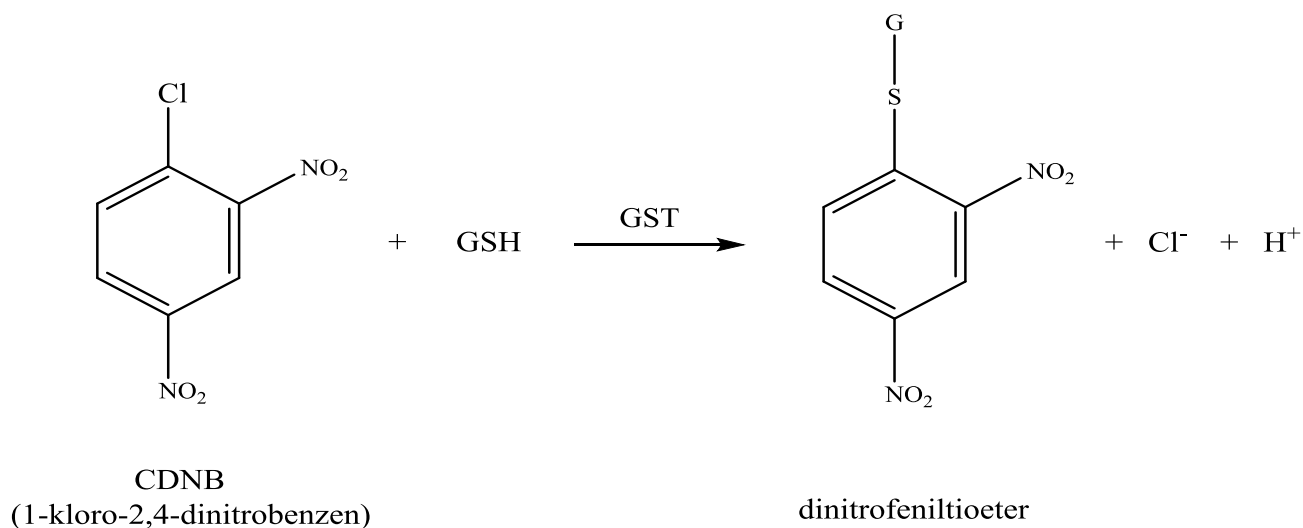
Reagens 1: 100 mM KP pufer pH 6,5 + 1 mM EDTA

Reagens 2: 10 mM reducirani glutation (GSH) otopljen u Reagensu 1

Reagens 3: 100 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) otopljen u vrućem 96%-tnom etanolu

Reakcijska smjesa:

870 μ L Reagensu 1 + 10 μ L Reagensu 3 + 100 μ L Reagensu 2 + 20 μ L uzorka



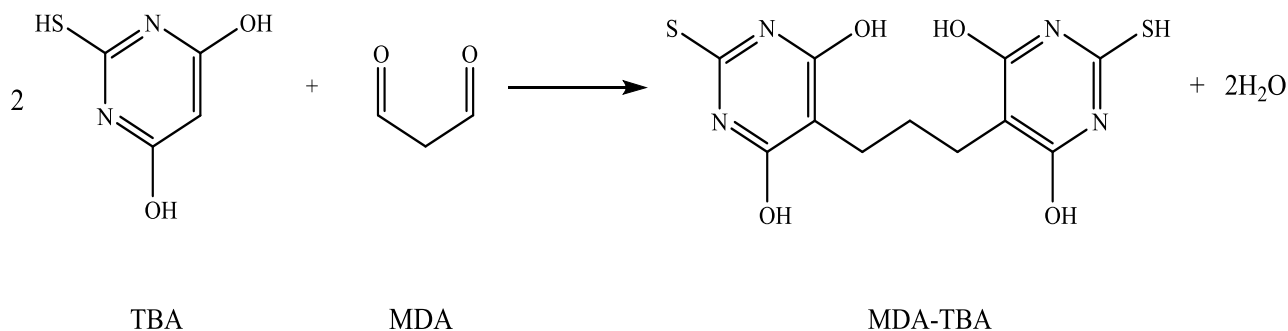
Slika 14. Nastajanje konjugiranog proizvoda, dinitrofeniltioetera
(prilagođeno iz Habig i Jacoby, 1981).

2.3.1.8. Određivanje sadržaja malondialdehida

Oštećenje lipida može se odrediti spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije MDA koji u biološkim uzorcima reagira s tiobarbiturnom kiselinom u jakim kiselim uvjetima i uz zagrijavanje. Ovom reakcijom formira se proizvod TBA-MDA koji se zatim mjeri.

Homogenizirani uzorci (100 μL) pomiješani su s 200 μL 10 %-tne trikloroctene kiseline (TCA) uz dodatak 0,01%-tnog butiliranog hidroksitoluena i s 300 μL 0,67 %-tne tiobarbiturne kiseline (TBA). Smjesa je zagrijavana 25 minuta na 95 $^{\circ}\text{C}$ u sušioniku. Nakon grijanja, svi su uzorci naglo ohlađeni u ledenoj kupelji i prije mjerenja promućkani na tresilici kako bi bili homogeni. Apsorbancija je očitavana na 532 nm, a kao slijepa proba korištena je otopina 0,67 %-tne TBA.

Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa, pri čemu nastaje MDA. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, pri čemu se stvara crvenkasti kromogen (Slika 15) kojem se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama nmol po mg proteina uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



Slika 15. Nastajanje kompleksa MDA-TBA (Janero, 1990).

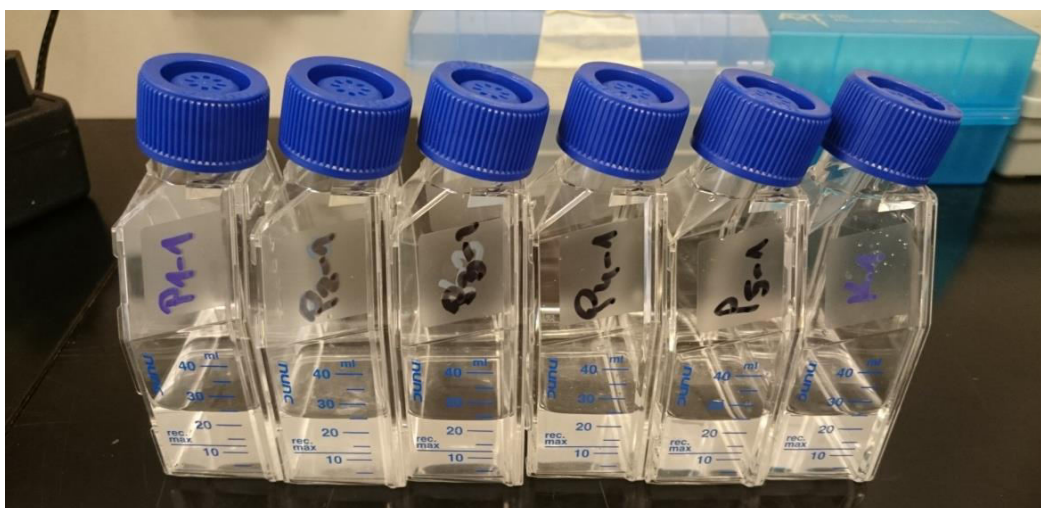
2.3.2. *Daphnia magna*: akutni imobilizacijski test

2.3.2.1. Uzgoj vodenbuha

Vodenbuhe su uzgojene u laboratoriju u umjetnoj vodi. Dan prije postavljanja pokusa, u poseban aerirani i grijani ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) akvarij, odvojene su trudne vodenbuhe jer se u pokusu, prema smjernicama protokola (OECD 202, 2004), koriste jedinke mlađe od 24 h. Trudne vodenbuhe mogu se lako prepoznati po crnim jajašcima koja nose na leđnoj strani tijela. Voda je bila dodatno grijana (oko 24°C) jer toplina potiče polaganje jajašaca.

2.3.2.2. Izlaganje

U pokusu s vodenbuhama, svaki je uzorak postavljen u četiri replike po 30 mL vode i deset jedinki (ukupan volumen testirane vode po postaji je 120 mL i četrdeset jedinki, $N = 40$). Kao kontrola korištena je svježe pripremljena umjetna voda (destilirana voda, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , KCl) u kojoj su se vodenbuhe uzgajile. U pokusu su se koristile jedinke mlađe od 24 h (OECD 202, 2004). Test izlaganja trajao je 48 h, a uzorci s vodenbuhama (Slika 16) držani su u mraku na temperaturi između 18°C i 22°C . Nakon 24 h i 48 h provjeravali su se sljedeći parametri: stopa imobilizacije i smrtnosti (OECD 202, 2004), presvlačenje, promjene u ponašanju i kretanju (pomoću programa ToxTrac®) te promjene u izgledu i boji. Provjera nepokretnih odnosno mrtvih jedinki provodi se na način da se posude nježno protresu nekoliko puta i uoče jedinke koje ne proplivaju u roku od 15 sekundi. Ako jedinka ne pliva, ali pomiče ticala, onda je imobilizirana, a ukoliko se ne vide nikakvi pokreti, jedinka se smatra mrtvom.



Slika 16. Izlaganje vodenbuha.

2.3.2.3. Snimanje i analiza kretanja

Snimanje kretanja provodilo se nakon 24 h. Vodenbuhe su se snimale u posudama u kojima su bile izlagane uzorkovanoj vodi kako bi ih se što manje izlagalo stresu prilikom prebacivanja u pločice. Snimanje je trajalo 6 minuta i nakon toga se analiziralo kretanje (3 x 1 minuta) pomoću računalnog programa ToxTrac® (Slika 17). Praćeni parametri bili su prosječna brzina, prosječno ubrzanje, stopa pokretljivosti i ukupna prijeđena udaljenost.

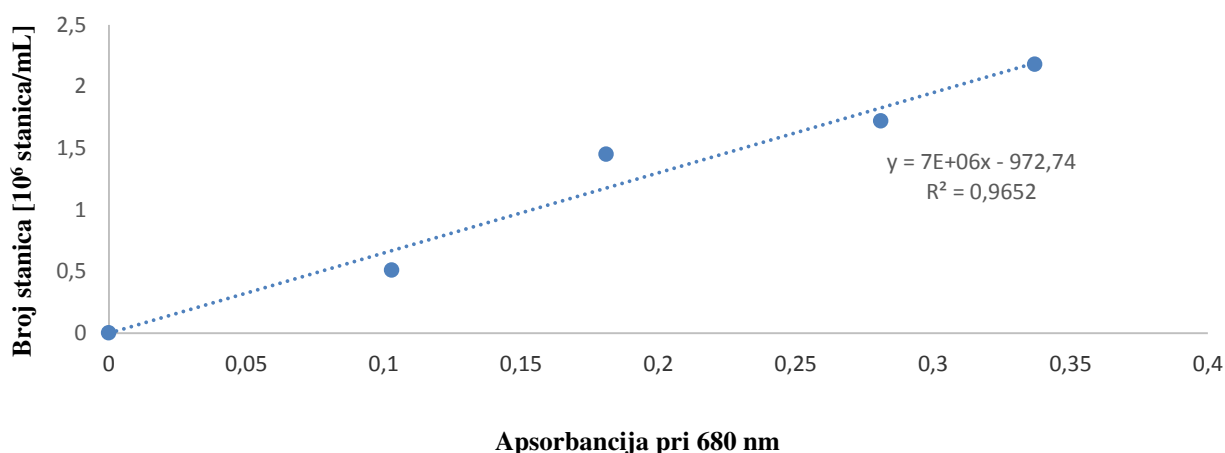


Slika 17. Analiza kretanja vodenbuha programom ToxTrac®.

2.3.2.4. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja

Nakon 48 h proveden je test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja (eng. *post-exposure feeding test*, PEFT) uz korištenje alge *Chlorella vulgaris*. Alge korištene za pokus uzgojene su u kulturi u tekućem hranjivom mediju u kontroliranim uvjetima. Uzeta je jedna tikvica s algama uzgojenim u dovoljnoj gustoći te je oko 2 mL otopine s algama dodano u čistu plastičnu neprozirnu epruvetu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 2000 rpm dekantiran je tekući supernatant, a iz zelenog taloga algi i uz dodatak svježe pripremljene umjetne vode pripremljena je otopina s algama za hranjenje (omjer razrjeđenja: 10 μ L taloga algi i 50 mL umjetne vode). Početna apsorbancija (oko 0,050 AU (eng. *absorbance units*)) na valnoj duljini od 680 nm odgovarala je početnoj koncentraciji algi (0 h) od 5×10^5 stanica/mL u svakoj od testnih posuda. Na Slici 18. prikazana je kalibracijska krivulja alge *Chlorella vulgaris* koja je korištena za baždarenje rezultata hranjenja vodenbuha.

Pokus je izveden u osam replika po postaji. U 15 mL otopine s algama dodano je pet jedinki vodenbuha, a hranjenje se odvijalo na temperaturi od 20 ± 2 °C u mraku kako bi se spriječio nekontrolirani rast algi. Pomoću spektrofotometra (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena) određena je točna koncentracija algi na početku pokusa (0 h) u svakoj od testnih posuda mjereći apsorbanciju na 680 nm. Apsorbancija je potom mjerena nakon 4 h i nakon 18 – 20 h (hranjenje preko noći).



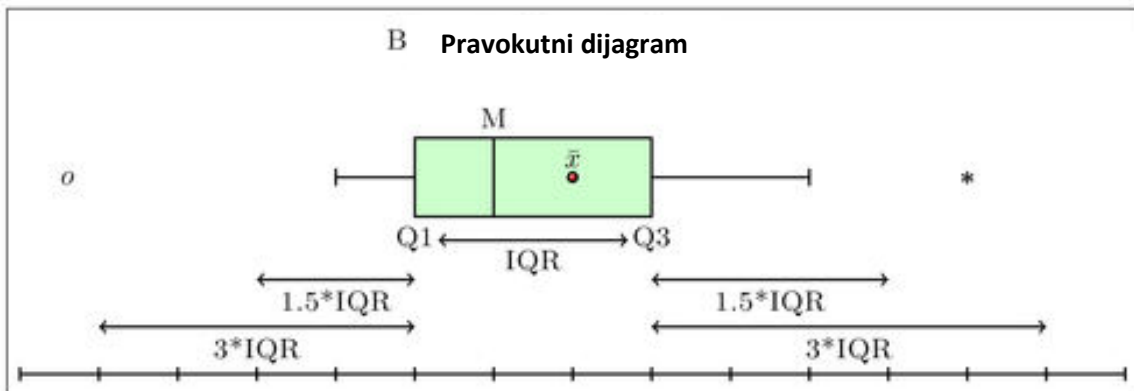
Slika 18. Kalibracijska krivulja alge *Chlorella vulgaris*.

2.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz provedeni su korištenjem računalnog programa GraphPad Prism 6 (za obradu i statističku analizu kretanja vodenbuha), programskog jezika Python (za obradu i statističku analizu kretanja rakušaca) te Excel programa Microsoft Office paketa. Brojčani podatci su predstavljeni u obliku srednje vrijednosti (sr.vr.) svih testnih replika uz pridruženu vrijednost standardne devijacije (\pm SD) ili su prikazani grafikonom kutijastog dijagrama (eng. *box-plot*) kao na Slici 19. Ukoliko je za prikaz korišten pravokutni dijagram, pravokutnik na grafu prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije (eng. *whisker*) najmanji i najveći dobiveni rezultat za to mjerenje (Slika 19). Razlike između eksperimentalnih grupa i kontrolne skupine testirane su jednosmjernom analizom varijance – *one way* ANOVA i *post hoc* testom višestrukih usporedbi (Dunnett test ili Tukey test). Normalnost raspodjele podataka provjerena je D'Agostino-Pearson testom normalnosti. Ukoliko je raspodjela podataka odstupala od normalne (neparametrijske metode), za usporedbu više skupina korišten je Kruskal-Wallis test (uz Dunn's *post hoc* test). Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) te $p < 0,001$ (***)).

Podatci kretanja rakušaca iz programa ToxTrac® preneseni su u Excel tablicu u matričnom formatu za lakše učitavanje. Za četiri ključne mjerne veličine (prosječna brzina, prosječno ubrzanje, stopa pokretljivosti, ukupna prijeđena udaljenost) filtrirani su podatci za 24 h i 48 h koji su korišteni u daljnjoj analizi. Za obradu i statističku analizu kretanja rakušaca korišten je programski jezik Python (URL 2) s bibliotekama pandas (McKinney, 2010), statsmodels (Seabold i Perktold, 2010) te matplotlib (Hunter, 2007) i seaborn (URL 5) za vizualizaciju te jezik R (URL 3) u kojem je napravljena analiza varijance. Sirovi podatci su provjereni na odstupajuće vrijednosti. U tu svrhu napisana je skripta (eng. *script*) koja izračunava interkvartilni raspon.

Kvartili su vrijednosti statističkog obilježja koje statistički niz dijele na četiri jednaka dijela, a mogu se podijeliti na donji i gornji kvartil (25 % i 75 % elemenata skupa). Interkvartilni raspon je razlika između donjeg i gornjeg kvartila u nekom podatkovnom stupcu ili vektoru. On predstavlja raspon unutar kojeg se nalazi središnjih 50 % elemenata skupa. Vrijednosti su filtrirane prema danu/satima(24h,48h)/mjerenom parametru te podijeljene u grupe iz kojih su izuzete vrijednosti niže od $Q1-1.5 \times IQR$ i više od $Q3+1.5 \times IQR$ (Slika 19).



Slika 19. Izgled pravokutnog dijagrama.

3. REZULTATI

3.1. Kemijska karakterizacija vode

U svim je uzorcima vode izmjerena temperatura vode, koncentracija i zasićenje kisika, a vrijednosti parametara prikazane su kao srednja vrijednost svakog parametra \pm SD. Temperatura ($^{\circ}$ C) je iznosila $25,48 \pm 0,13$, koncentracija kisika (mg/L) $8,08 \pm 0,08$ te zasićenje kisika (%) $99,83 \pm 0,89$ u svim izmjerenim uzorcima vode. Kroz trajanje pokusa vrijednosti navedenih parametara bile su konstantne i nisu odstupale od navedene srednje vrijednosti. U uzorcima vode analizirana je prisutnost 571 organskog onečišćivala, a detektirana su 483 spoja koja su razvrstana u pet glavnih skupina: farmaceutici, pesticidi, industrijske kemikalije, hormoni i „ostalo“ (Tablica 4).

Tablica 4. Broj zabilježenih organskih onečišćivala u uzorcima vode za svaku postaju i skupinu. Stupac „UBAK“ prikazuje ukupan broj analiziranih kemikalija, a stupac „UBDK“ ukupan broj detektiranih kemikalija za svaku kategoriju organskih onečišćivala.

Skupine organskih onečišćivala	UBAK	UBDK	Jesenice	Jankomir	Hrušćica	Rugvica	Lukavec
Farmaceutici	234	196	142	154	171	164	165
Pesticidi	291	242	213	170	182	185	179
Industrijske kemikalije	31	30	28	27	28	27	27
Hormoni	8	8	8	8	8	8	8
Ostalo	7	7	7	7	7	7	7
Ukupno	571	483	398	366	396	391	386

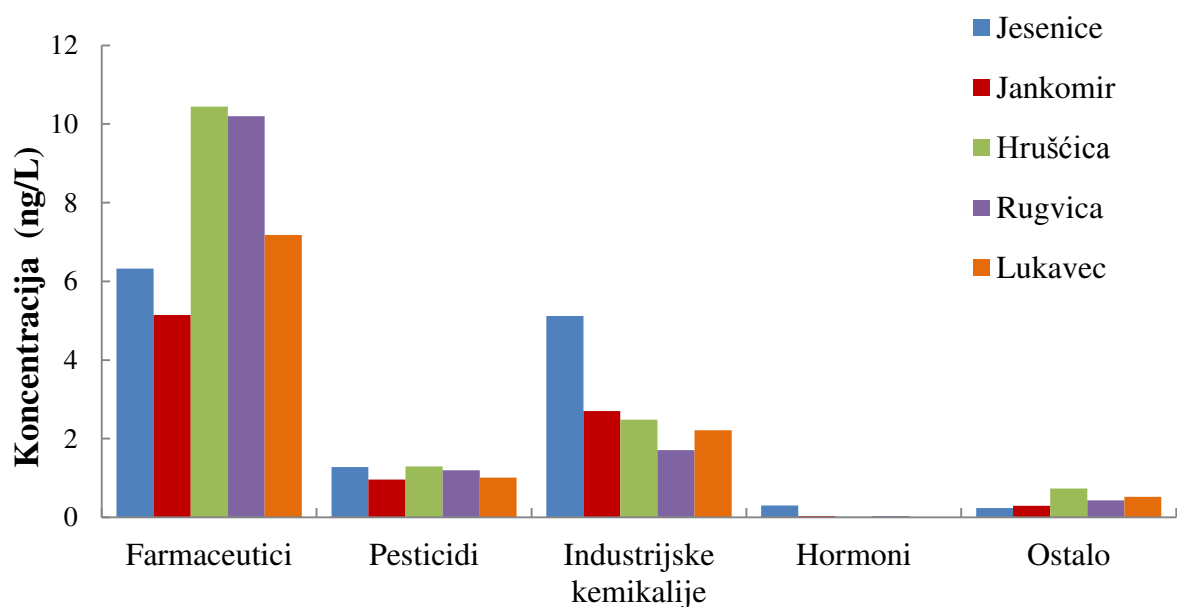
S obzirom na uzorkovane postaje, najviša ukupna koncentracija ispitivanih organskih onečišćivala (OO) utvrđena je u uzorku vode s postaje Hrušćica (14,98 ng/L), zatim s postaja Rugvica i Jesenice, koje imaju slične koncentracije (13,57 ng/L odnosno 13,27 ng/L), zatim s postaje Lukavec (10,94 ng/L), dok je najniža ukupna koncentracija OO bila zabilježena u uzorku vode s postaje Jankomir (9,15 ng/L). U svakom je uzorku vode otkriven širok raspon vrsta OO i to u sličnom broju: Jesenice – 398, Jankomir – 366,

Hrušćica – 396, Rugvica – 391 i Lukavec – 386 (Tablica 4). Ukupno su detektirana 483 spoja, od 571 analiziranog, a najveći broj vrsta detektiranih OO pripada skupini pesticida (242 spoja), no njihova je koncentracija niža u odnosu na ukupnu koncentraciju farmaceutika i industrijskih kemikalija. Prema broju detektiranih vrsta spojeva, nakon skupine pesticida slijedi skupina farmaceutika (196 spojeva), koji su ujedno pronađeni i u najvećoj ukupnoj koncentraciji na svakoj postaji. U odnosu na pesticide i farmaceutike, najmanji broj detektiranih spojeva je iz skupine industrijskih kemikalija (30 spojeva), ali je njihova ukupna koncentracija veća od ukupne koncentracije pesticida. Na svim su postajama nađeni svi spojevi (100 %) iz skupine hormoni (8 spojeva) i „ostalo“ (7 spojeva). Od ukupnog broja detektiranih farmaceutika na Jesenicama je pronađeno 72,45 %; na Jankomiru 78,57 %; na Hrušćici 87,24 %; na Rugvici 83,67 % te na Lukavcu 84,18 %. Od ukupnih detektiranih pesticida, najviše vrsta pronađeno je na Jesenicama (88,02 %), zatim na Rugvici (76,45 %), Hrušćici (75,21 %), Lukavcu (73,97 %) te na kraju najmanje vrsta na Jankomiru (70,25 %). Na Jesenicama i Hrušćici nađeno je 28 od 30 detektiranih vrsta industrijskih kemikalija (93,33 %), a na ostalim postajama jedna manje odnosno 90,00 % (Tablica 4).

Farmaceutski proizvodi su, prema svom djelovanju, razvrstani u sljedeće podskupine: hipnotici/antikonvulzanti/anestetici, antibiotici, halucinogeni/stimulansi/droge, antiepileptici/neuroleptici, opiodi, analgetici, kardiovaskularni lijekovi, antidepresivi, antiparazitici, diuretici, steroidni protuupalni lijekovi i drugo (Stipaničev i sur., 2017). Pesticidi su uključivali herbicide, insekticide i fungicide. Industrijske kemikalije podrazumijevaju širok raspon perfluoralkilnih i polifluoralkilnih tvari kao što su i 1-H benzotriazol, bisfenol A (BPA), 4-nitrofenol, 4-para-nonilfenol, 4-terc-oktilfenol, heksabromociklododekan (HBCDD), oktilfenol mono- i dietoksilati (OP1EO i OP2EO) te nonilfenol mono- i dietoksilati (NP1EO i NP2EO). Skupina hormona uključivala je i sintetičke i prirodne hormone, a kemijskom analizom utvrđeni su sljedeći spojevi: androstendion, testosteron, estriol, ekvilin, 17 α -etinilestradiol, estron, 17 β -estradiol i progesteron. U skupini „ostalo“ bili su zabilježeni acesulfam, oktinoksat, iopromid, 2-NP-AOZ, 4-acetilaminoantipirin, 4-formilaminoantipirin te N-desmetilklozapin.

Farmaceutici su na svim postajama zabilježeni u visokim koncentracijama: 10,44 ng/L na Hrušćici; 10,20 ng/L na Rugvici; 7,18 ng/L na Lukavcu; 6,32 ng/L na Jesenicama te 5,15 ng/L na Jankomiru. Industrijske kemikalije zabilježene su u sljedećim koncentracijama: 5,12 ng/L na Jesenicama; 2,71 ng/L na Jankomiru; 2,49 ng/L na Hrušćici; 2,22 ng/L na Lukavcu te 1,71 ng/L na Rugvici. Pesticidi su pronađeni u manjim

koncentracijama: 1,29 ng/L na Hruščici; 1,28 ng/L na Jesenicama; 1,20 ng/L na Rugvici; 1,01 ng/L na Lukavcu te 0,96 ng/L na Jankomiru. Hormoni su bili prisutni u najnižim koncentracijama na svim postajama, osim na Jesenicama gdje je bila prisutna povišena koncentracija: 0,31 ng/L na Jesenicama; 0,038 ng/L na Jankomiru; 0,032 ng/L na Rugvici; 0,022 ng/L na Hruščici te 0,005 ng/L na Lukavcu. Skupina „ostalo“ zabilježena je u sljedećim koncentracijama: 0,73 ng/L na Hruščici; 0,52 ng/L na Lukavcu; 0,43 ng/L na Rugvici; 0,29 ng/L na Jankomiru i 0,24 ng/L na Jesenicama (Slika 20).



Slika 20. Zastupljenost skupina organskih onečišćivala na uzorkovanim postajama.

Prema koncentraciji, najdominantnija skupina organskih onečišćivala jesu farmaceutici koji čine udio od 47,66 % od ukupne zabilježene koncentracije OO na postaji Jesenice, 56,26 % na Jankomiru, 65,67 % na Lukavcu, 69,72 % na Hruščici do čak 75,14 % na Rugvici (Slike 21 – 25). Ukupna koncentracija farmaceutika bila je znatno viša u uzorcima vode s postaja Hruščica (10,44 ng/L) i Rugvica (10,20 ng/L) u usporedbi s ostalim postajama, a tome su doprinijele povišene koncentracije halucinogena/stimulansa/droga (3,68 ng/L na postaji Rugvica) te antibiotika (3,37 ng/L na postaji Hruščica). Na postaji Jesenice najzastupljenije podskupine farmaceutika su analgetici (27,21 %) i antibiotici (27,00 %). Podskupina halucinogeni/stimulansi/droge najdominantnija je na postajama Jankomir (45,46 %), Rugvica (36,13 %) i Lukavec (30,14 %) zbog ustanovljene velike količine nikotina, kotinina i kofeina,

a na postaji Hruščica najzastupljeniji su antibiotici (32,30 %) uz halucinogene/stimulanse/droge (25,57 %).

U skupini farmaceutika, najveći broj vrsta pripada antibioticima koji su u visokim koncentracijama pronađeni u svim uzorcima. Antibiotici zabilježeni u visokim koncentracijama bili su penicilini (amoksicilin, kloksacilin te nafcilin), tetraciklini (doksiciklin, minociklin, oksitetraciklin te tetraciklin HCl) te sulfonamidi (sulfapiridin). Amoksicilin je najviše bio prisutan na Hruščici, zatim na Jankomiru i Rugvici, kloksacilin na Jesenicama, dok uopće nije zabilježen na Rugvici i Lukavcu, nafcilin, doksiciklin i oksitetraciklin na Jesenicama, minociklin na Rugvici, tetraciklin HCl na Hruščici i Rugvici te sulfapiridin na Hruščici, Lukavcu i Rugvici, dok uopće nije zabilježen na postajama Jesenice i Jankomir. U podskupini halucinogeni/stimulansi/droge najveći udio otpada na kofein (u najvećoj koncentraciji na Hruščici, Rugvici i Lukavcu), nikotin (najviše na Rugvici i Jankomiru) i kotinin (najviše na Hruščici i Rugvici). Hipnotici/antikonvulzanti/anestetici te analgetici su također utvrđeni u relativno visokim koncentracijama u uzorcima vode rijeke Save; prva podskupina u najvećim koncentracijama na postajama Hruščica (1,75 ng/L) i Rugvica (1,71 ng/L), a druga podskupina na postaji Jesenice (1,72 ng/L). Iz prve podskupine u najvećoj je koncentraciji bio prisutan fenobarbital i to na postajama Rugvica, Lukavec i Hruščica, a iz druge podskupine u većoj su koncentraciji bili utvrđeni ibuprofen (prisutan na svim postajama, osim na Jankomiru, a najviše na Jesenicama i Rugvici), etodolak (prisutan samo na postaji Jesenice), naproksen (najviše na Jesenicama i Rugvici) te acetilsalicilna kiselina (najviše na Lukavcu, dok na Jankomiru uopće nije zabilježena). Najveća koncentracija kardiovaskularnih lijekova izmjerena je na postaji Hruščica (1,25 ng/L), a iz te je podskupine u najvećoj koncentraciji pronađen metoprolol. Steroidni protuupalni lijekovi u povišenoj koncentraciji uočeni su na Jesenicama (0,97 ng/L) gdje je zabilježen fludrokortizon acetat. Ostale podskupine farmaceutika bile su prisutne u bitno nižim koncentracijama.

Druga najdominantnija skupina na svim postajama, prema koncentraciji, jesu industrijske kemikalije zastupljene s udjelom od 38,60 % (udio od ukupne koncentracije OO na toj postaji) na Jesenicama; 29,58 % na Jankomiru; 20,29 % na Lukavcu; 16,61 % na Hruščici te 12,62 % na Rugvici (Slike 21 – 25). Od industrijskih kemikalija, u višim koncentracijama detektirani su nonilfenol monoetoksilat (NP1EO) na postajama Jankomir i Lukavec, nonilfenol dietoksilat (NP2EO) na postajama Hruščica i Jankomir, oktilfenol monoetoksilat (OP1EO) na Lukavcu, oktilfenol dietoksilat (OP2EO) na Hruščici i Jankomiru,

BPA na postajama Rugvica i Jesenice, 4-terc-oktilfenol na postaji Jesenice, 1-H benzotriazol na postaji Jankomir te iznimno povišena koncentracija 4-para-nonilfenola na Jesenicama.

Na trećem mjestu svih postaja nalaze se pesticidi čije su koncentracije u svim uzorcima vode bile slične. Udio pesticida, od ukupne zabilježene koncentracije OO na pojedinoj postaji, na Jankomiru je iznosio 10,54 %; na postaji Jesenice 9,61 %; na postaji Lukavec 9,22 %; na postaji Rugvica 8,82 % te na postaji Hrušćici 8,63 % (Slike 21 – 25). Što se tiče skupine pesticida, dominiraju insekticidi koji su na svim postajama izmjereni u većoj koncentraciji nego herbicidi i fungicidi, a najveći udio insekticida zabilježen je na postaji Jesenice (insekticidi čine 61,21 % od svih zabilježenih pesticida na toj postaji) gdje su u većim koncentracijama prisutni bili spojevi spiromesifen i halofenozid.

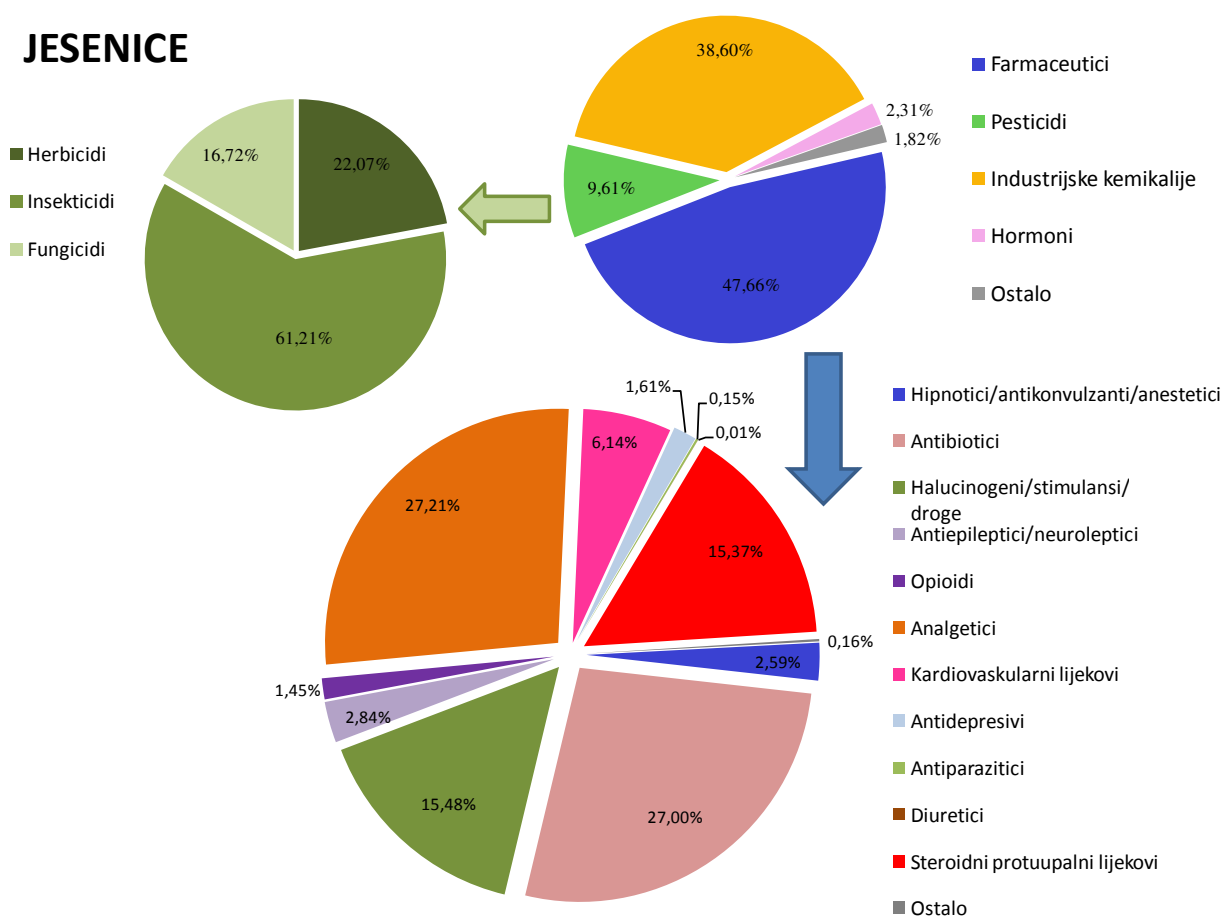
Hormoni i zasebna skupina „ostalo“ bili su prisutni u znatno nižim koncentracijama na svim postajama. Najveća koncentracija sintetskih hormona, posebice progesterona (0,30 ng/L), utvrđena je u uzorku vode s postaje Jesenice, dok su acesulfam (0,39 ng/L) i iopromid (0,19 ng/L) iz skupine „ostalo“ bili prisutni u višim koncentracijama na postaji Hrušćica (Slike 21 – 25).

Zabilježena organska onečišćivala i njihove koncentracije razlikovale su se od postaje do postaje, a u Tablici 5 prikazano je deset najzastupljenijih zabilježenih kemikalija za svaku postaju zajedno s koncentracijom i klasifikacijom spoja.

Tablica 5. Popis deset kemikalija i njihovih kategorija koje su nađene u najvećim koncentracijama na pojedinim postajama. Koncentracije su izražene u ng/L.

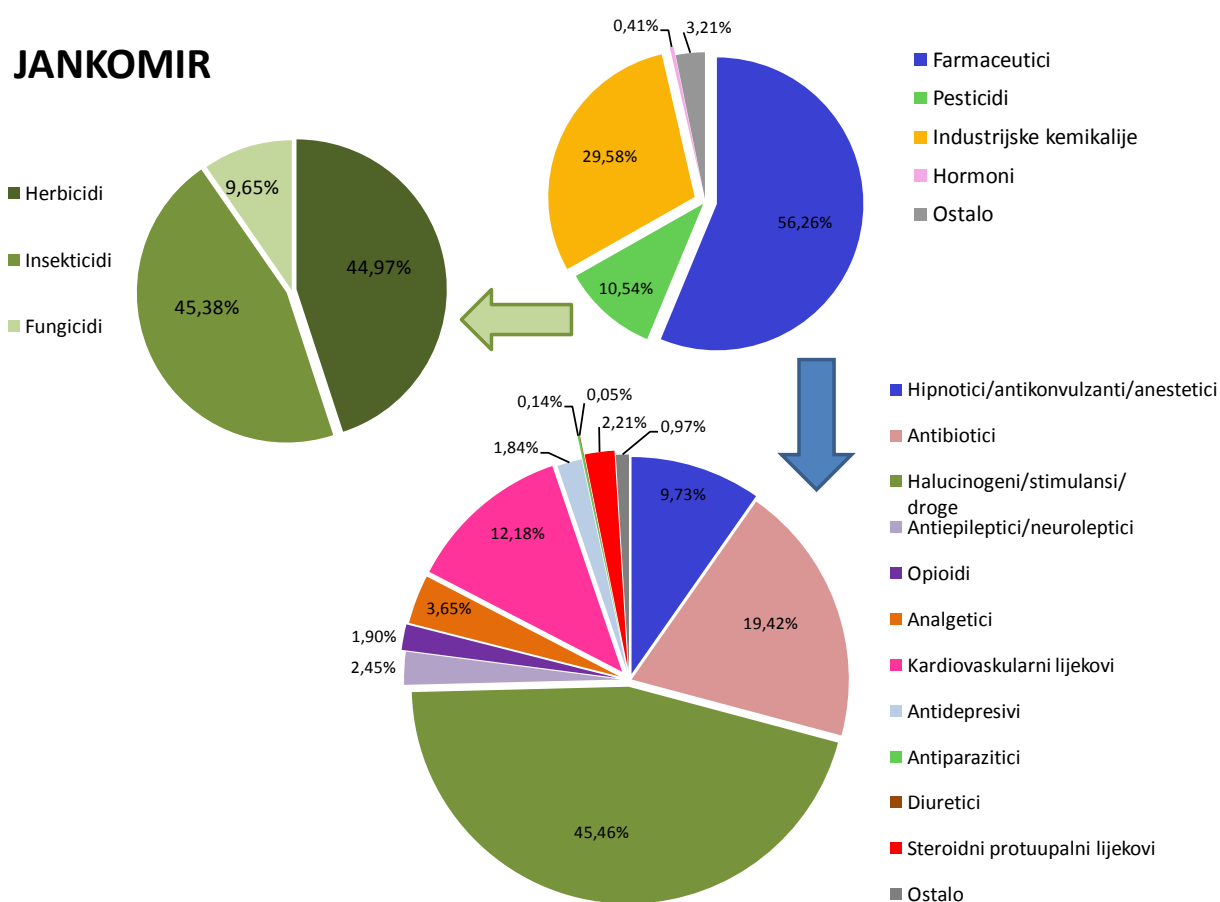
Jesenice	Jankomir	Hrušćica	Rugvica	Lukavec
4-para-nonilfenol (ind.kemikalija) 3,52	Nikotin (stimulans) 1,56	Metoprolol (kardiov.lijek) 1,21	Nikotin (stimulans) 2,24	Fenobarbital (hipnotik) 1,27
Fludrokortizon-acetat (steroidni protuupalni lijek) 0,79	NP1EO (ind.kemikalija) 0,71	Nikotin (stimulans) 1,20	Fenobarbital (hipnotik) 1,29	Kafein (stimulans) 0,98
Naprosken (analgetik) 0,55	OP2EO (ind.kemikalija) 0,61	Sulfapiridin (antibiotik) 1,18	Kafein (stimulans) 1,10	Nikotin (stimulans) 0,85
4-terc-oktilfenol (ind.kemikalija) 0,54	Metoprolol (kardiov.lijek) 0,57	Fenobarbital (hipnotik) 1,15	Tetraciklin HC (antibiotik) 0,67	NP1EO (ind.kemikalija) 0,71
Nafcilin natrijev monohidrat (antibiotik) 0,52	Amoksicilin (antibiotik) 0,57	Kafein (stimulans) 1,06	Sulfapiridin (antibiotik) 0,53	Sulfapiridin (antibiotik) 0,65
Ibuprofen (analgetik) 0,45	Kafein (stimulans) 0,50	Amoksicilin (antibiotik) 0,96	Metoprolol (kardiov.lijek) 0,50	Acetilsalicilna kiselina (analgetik) 0,58
Nikotin (stimulans) 0,43	4-para-nonilfenol (ind.kemikalija) 0,49	OP2EO (ind.kemikalija) 0,75	Bisfenol A (ind.kemikalija) 0,48	Metoprolol (kardiov.lijek) 0,57
Bisfenol A (ind.kemikalija) 0,41	NP2EO (ind.kemikalija) 0,31	Tetraciklin HC (antibiotik) 0,68	Amoksicilin (antibiotik) 0,45	OP2EO (ind.kemikalija) 0,52
Metoprolol (kardiov.lijek) 0,37	Fenobarbital (hipnotik) 0,25	NP1EO (ind.kemikalija) 0,56	Naprosken (analgetik) 0,44	4-para-nonilfenol (ind.kemikalija) 0,34
Etodolak (analgetik) 0,33	1H-benzotriazol (ind.kemikalija) 0,20	Acesulfam (umjetno sladilo) 0,39	4-para-nonilfenol (ind.kemikalija) 0,33	NP2EO (ind.kemikalija) 0,22

Na postaji Jesenice (Slika 21) najdominantniji su farmaceutici (47,66 %), a najzastupljenije podskupine analgetici (27,21 %), antibiotici (27,00 %), halucinogeni/stimulansi/droge (15,48 %) te steroidni protuupalni lijekovi (15,37 %). Nakon njih slijede industrijske kemikalije (38,60 %) te pesticidi (9,61 %) od kojih su najizraženiji insekticidi (61,21 %), zatim herbicidi (22,07 %) te fungicidi s najmanjim udjelom (16,72 %). Hormoni čine velikih 2,31 %, a skupina „ostalo“ 1,82 %.



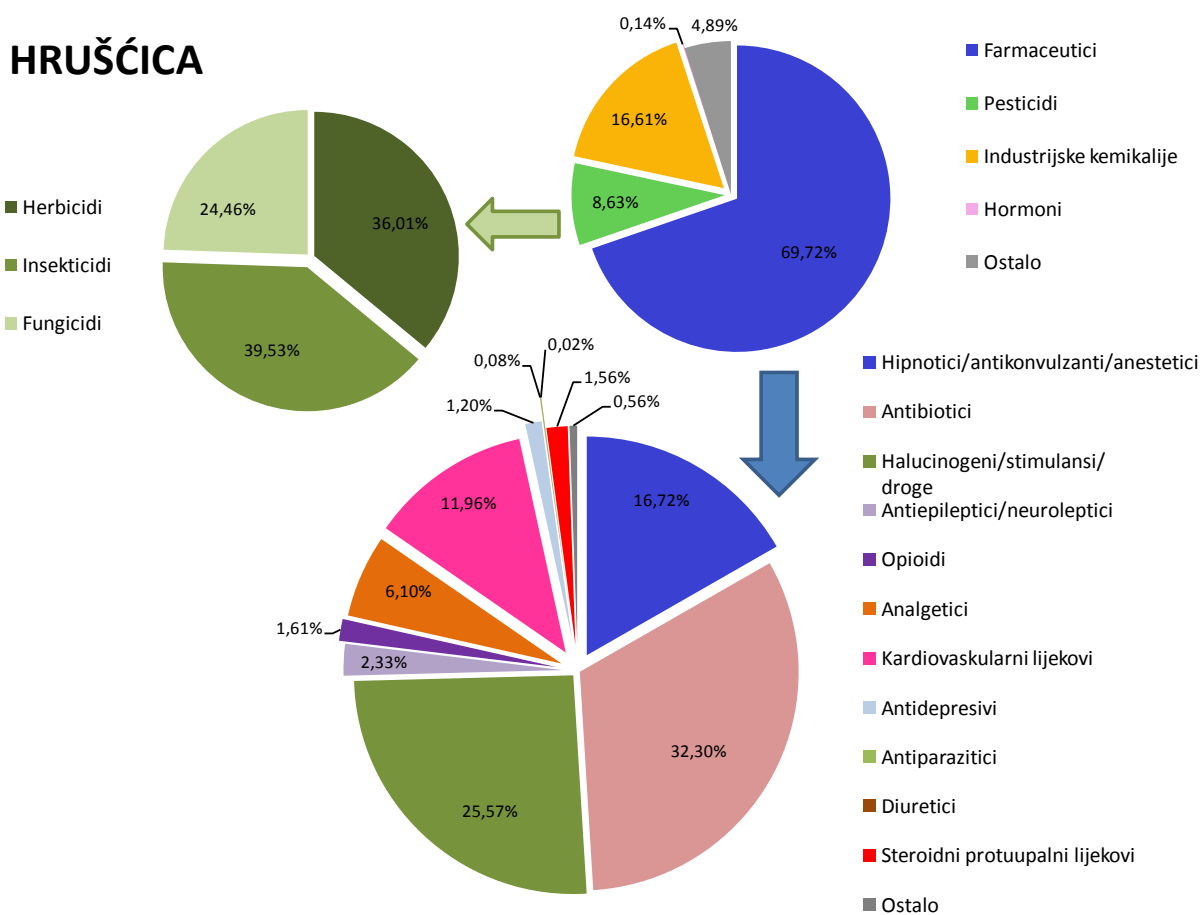
Slika 21. Zastupljenost glavnih skupina i podskupina u uzorku vode s postaje Jesenice.

Na postaji Jankomir (Slika 22) također dominiraju farmaceutici (56,26 %) s podskupinama halucinogeni/stimulansi/droge (45,46 %), antibiotici (19,42 %) te kardio-vaskularni lijekovi (12,18 %). Industrijske kemikalije čine 29,58 %, a pesticidi 10,54 %. Insekticidi (45,38 %) i herbicidi (44,97 %) su podjednako zastupljeni, a fungicidi čine 9,65 %. Hormoni se pojavljuju u malom udjelu od 0,41 %, a skupina „ostalo“ čini 3,21 %.



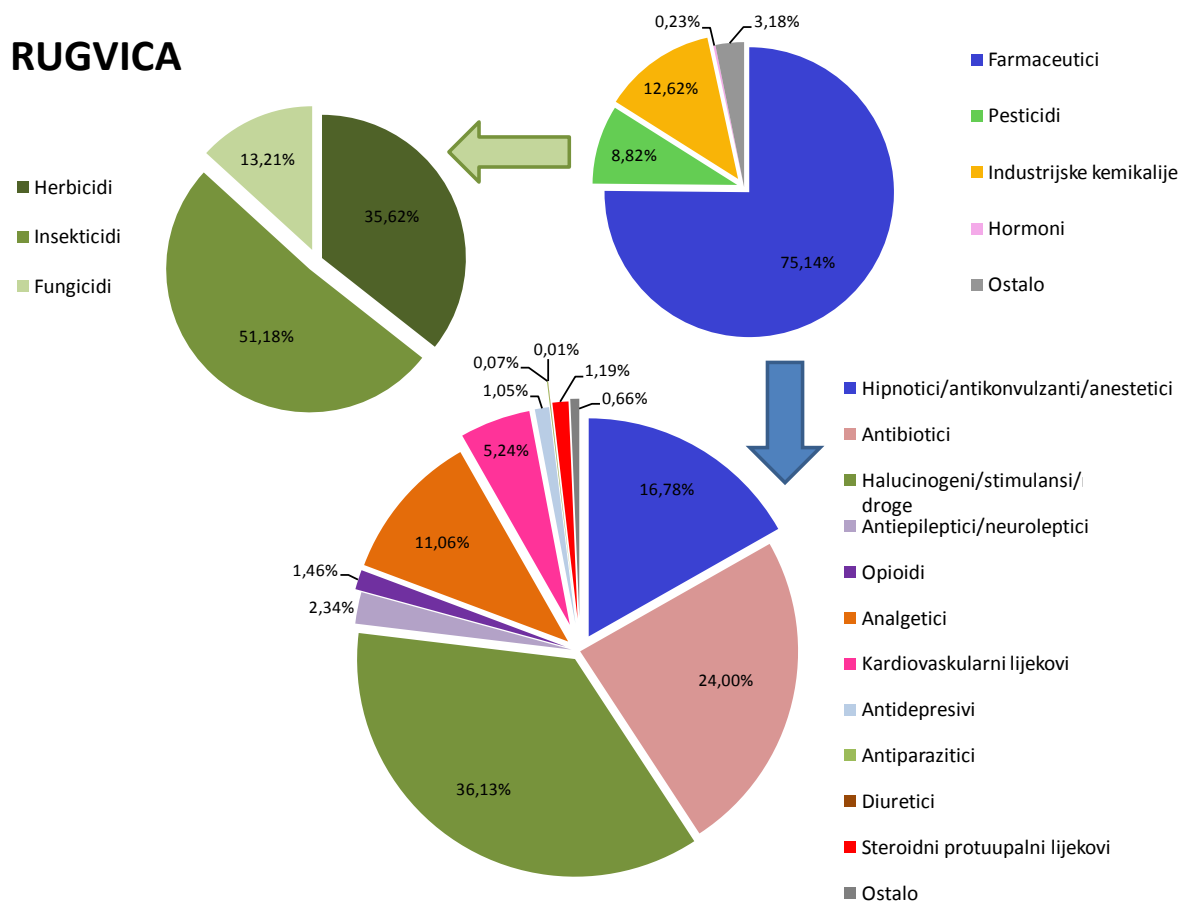
Slika 22. Zastupljenost glavnih skupina i podskupina u uzorku vode s postaje Jankomir.

Na postaji Hrušćica (Slika 23) također dominiraju farmaceutici (69,72 %) s podskupinama antibiotici (32,30 %) i halucinogeni/stimulansi/droge (25,57 %). Industrijske kemikalije čine 16,61 %, a pesticidi 8,63 %. Insekticidi (39,53 %) i herbicidi (36,01 %) su također podjednako zastupljeni kao i na postaji Jankomir, a fungicidi čine četvrtinu zabilježenih pesticida (24,46 %). Hormoni su prisutni u malom postotku (0,14 %), a skupina „ostalo“ čini 4,89 %.



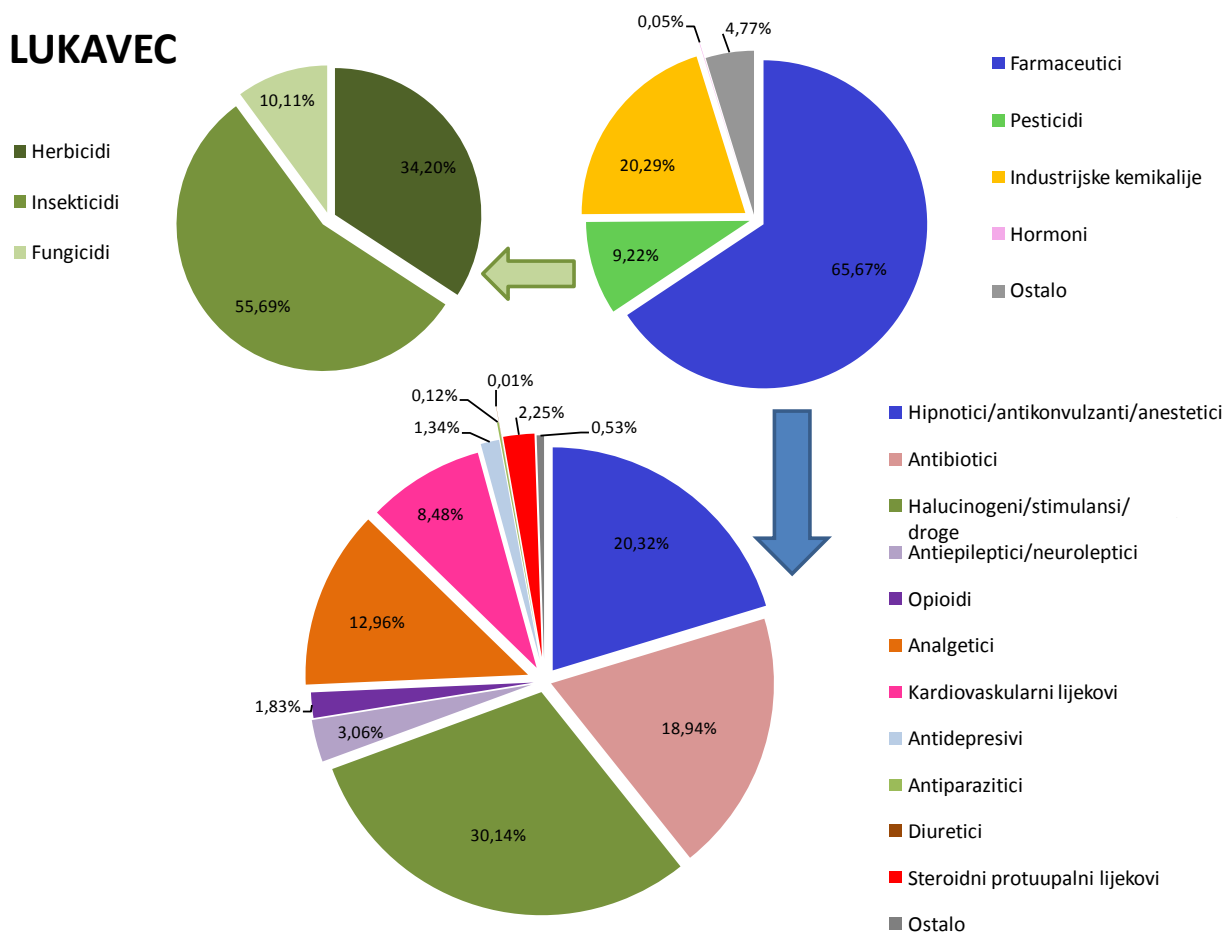
Slika 23. Zastupljenost glavnih skupina i podskupina u uzorku vode s postaje Hrušćica.

Na postaji Rugvica (Slika 24) najzastupljeniji su farmaceutici (75,14 %) i to halucinogeni/stimulansi/droge (36,13 %), antibiotici (24,00 %) te hipnotici/antikonvulzanti/anestetiци (16,78 %). Nakon njih slijede industrijske kemikalije (12,62 %) te pesticidi (8,82 %). Polovicu prisutnih pesticida čine insekticidi (51,18%), dok su herbicidi i fungicidi zastupljeni s 35,62 % odnosno 13,21 %. Hormoni čine 0,23 %, a skupina „ostalo“ 3,18 %.



Slika 24. Zastupljenost glavnih skupina i podskupina u uzorku vode s postaje Rugvica.

Na postaji Lukavec (Slika 25), kao i na svim drugima, najveći udio zauzimaju farmaceutici (65,67 %) s najzastupljenijim podskupinama halucinogeni/stimulansi/droge (30,14 %), hipnotici/antikonvulzanti/anestetici (20,32 %) te antibiotici (18,94 %). Industrijske kemikalije zauzimaju drugo mjesto s udjelom od 20,29 %, a pesticidi su na trećem mjestu s 9,22 %. Većinu zabilježenih pesticida čine insekticidi (55,69 %), zatim slijede herbicidi (34,20 %), dok su fungicidi prisutni s 10,11 %. Hormoni su na ovoj postaji zabilježeni u najmanjem udjelu (0,05 %), a skupina „ostalo“ čini 4,77 %.



Slika 25. Zastupljenost glavnih skupina i podskupina u uzorku vode s postaje Lukavec.

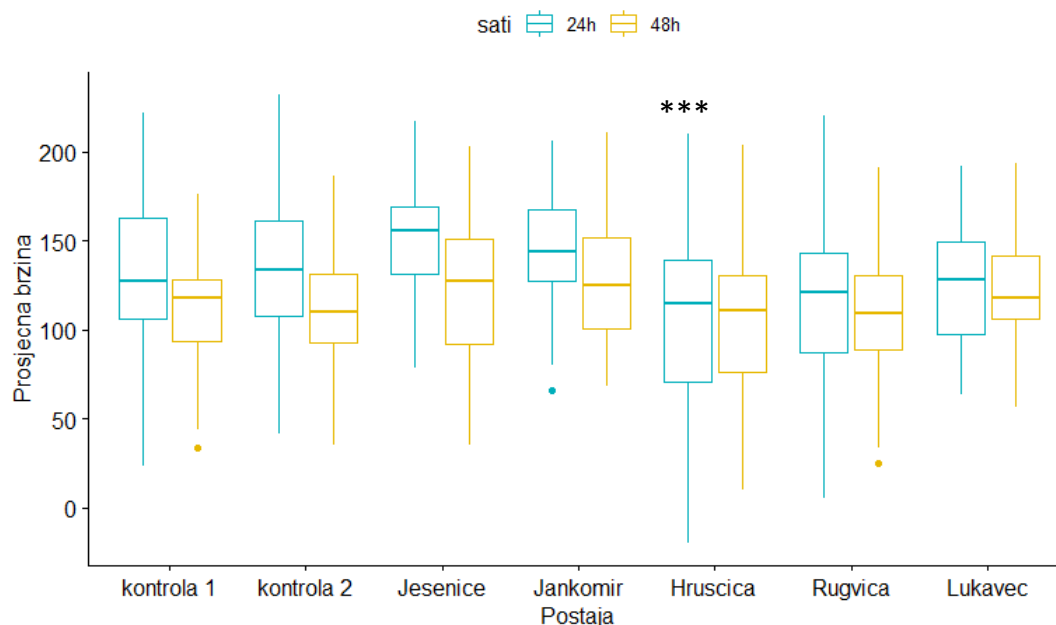
3.2. *Gammarus fossarum*: akutni test toksičnosti

3.2.1. Analiza kretanja

Postaje su analizirane svaka sa svojom kontrolom: K1 + Jesenice, Jankomir i Lukavec; K2 + Hrušćica i Rugvica. Rezultati su predstavljeni kao sr.vr. \pm SD. Statistička značajnost (* za $p < 0,05$; ** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$) na grafu naznačena je samo u usporedbi pojedine postaje s pripadajućom kontrolom.

3.2.1.1. Prosječna brzina – 24 h i 48 h

Na Slici 26. prikazana je prosječna brzina kretanja rakušaca. Uočeno je povećanje prosječne brzine na Jesenicama i Jankomiru (koja zatim značajno pada nakon 48 h) u odnosu na Hrušćicu i Rugvicu gdje je uočeno smanjenje u odnosu na kontrolu koje je uvjetovano izljevom otpadnih voda grada Zagreba, dok je na Lukavcu zabilježen blagi oporavak u odnosu na Hrušćicu i Rugvicu (Slika 26). Nakon 24 h, statistički značajno smanjenje brzine uočeno je između kontrole K2 ($100,25 \pm 24,66$) i postaje Hrušćica ($83,48 \pm 28,41$) ($p < 0,001$). Nakon 24 h izlaganja uočen je značajan pad brzine kretanja rakušaca izloženim vodi s postaja Hrušćica i Rugvica u odnosu na postaje Jesenice i Jankomir te pad brzine kretanja kod rakušaca izloženim vodi s postaje Lukavec u odnosu na Jesenice (sve sa statističkom značajnošću $p < 0,001$). Uočen je i pad brzine na Hrušćici u odnosu na Lukavec ($p < 0,05$). Pad brzine kretanja nakon 48 h izlaganja i dalje je prisutan na postaji Hrušćica u odnosu na postaje Jesenice ($p < 0,01$) i Jankomir ($p < 0,001$), na postaji Rugvica u odnosu na Jankomir ($p < 0,05$) te na postaji Hrušćica u odnosu na Lukavec ($p < 0,05$). Prosječna je brzina bila veća nakon 24 h u odnosu na 48 h. Najmanja vrijednost prosječne brzine zabilježena je nakon 24 h na postaji Hrušćica ($83,48 \pm 28,41$), a najviša na postaji Jesenice ($152,41 \pm 31,78$), također nakon 24 h.

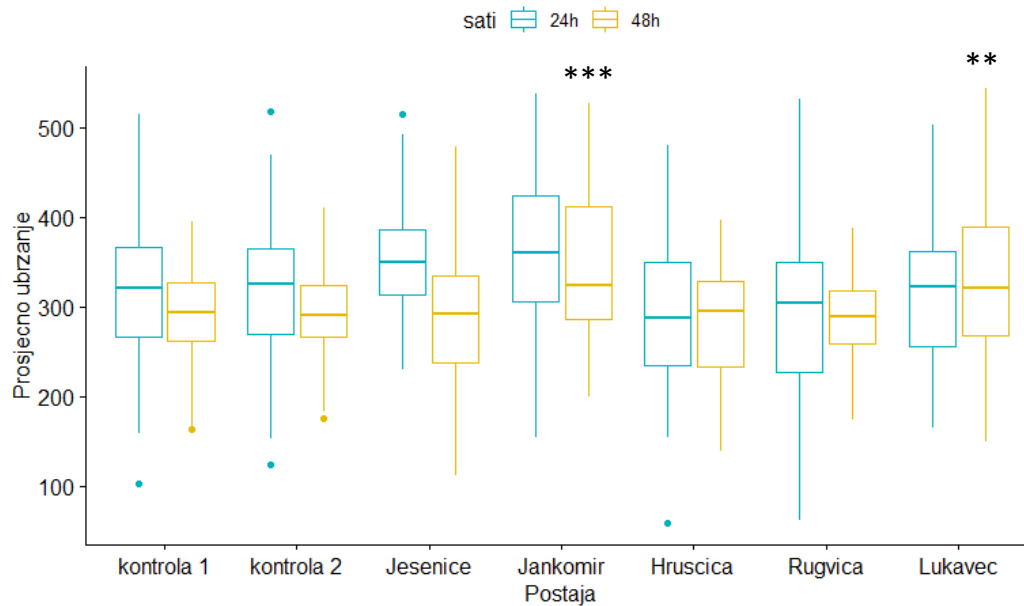


Slika 26. Grafički prikaz mjerenja prosječne brzine rakušaca nakon 24-satnog i 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Prosječna brzina kretanja izražena je u arbitrarnim pikselarnim jedinicama/s. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Točkice predstavljaju vrijednosti koje odskaku (eng. *outlayers*). Statistički značajne razlike označene su simbolom (***) za $p < 0,001$.

3.2.1.2. Prosječno ubrzanje – 24 h i 48 h

Na Slici 27. prikazano je prosječno ubrzanje rakušaca. Statistički značajan pad prosječnog ubrzanja nakon 24 h izlaganja uočen je na postajama Hrušćica i Rugvica u odnosu na postaje Jesenice i Jankomir (sve sa statističkom značajnošću od $p < 0,001$). Nakon 48 h izlaganja, statistički značajno povećanje uočeno je na postajama Jankomir ($345,40 \pm 81,09$) ($p < 0,001$) i Lukavec ($330,17 \pm 90,54$) ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu K1 ($291,51 \pm 51,90$). Statistički značajno smanjenje prosječnog ubrzanja, nakon 48 h izlaganja, postoji i na postajama Hrušćica i Rugvica u odnosu na Jankomir ($p < 0,001$), a statistički značajno povećanje ubrzanja uočeno je na postaji Jankomir u odnosu na Jesenice ($p < 0,001$) i na postaji Lukavec u odnosu na postaje Hrušćica i Rugvica ($p < 0,001$) te u odnosu na postaju Jesenice ($p < 0,01$). Prosječno je ubrzanje bilo veće nakon 24 h u odnosu na 48 h, izuzev postaje Lukavec gdje je nakon 48 h uočeno značajno veće ubrzanje. Najmanja vrijednost prosječnog ubrzanja zabilježena je na Hrušćici ($225,07 \pm 63,21$), a najviša na Jankomiru ($359,81 \pm 85,25$), obje nakon 24 h. Bitna razlika u prosječnom ubrzanju nakon 24 h i 48 h primijećena je na Jesenicama gdje ubrzanje značajno pada nakon 48 h. Na Jesenicama i

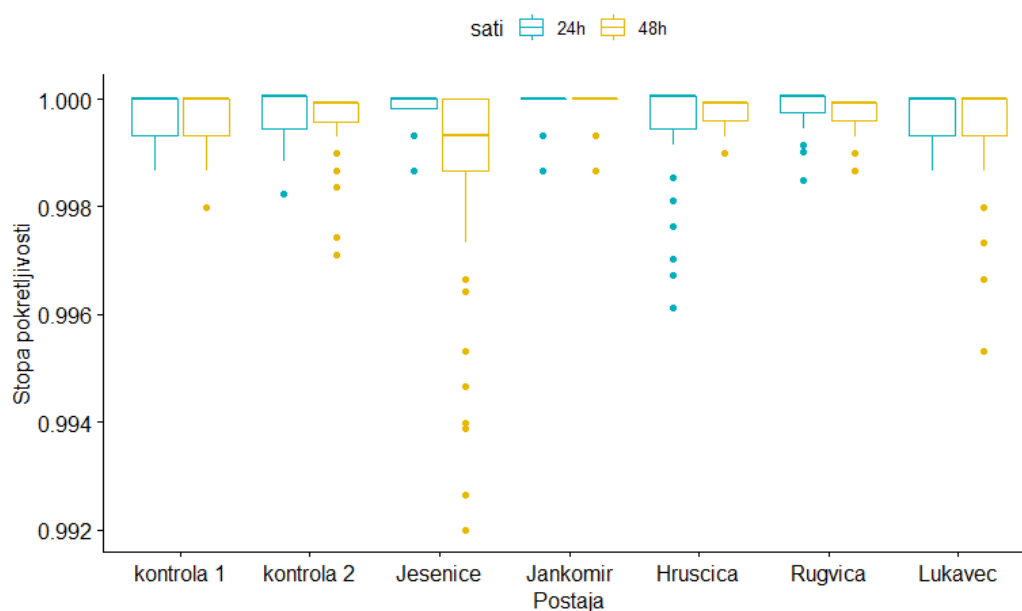
Jankomiru zabilježeno je veće ubrzanje u odnosu na Hrušćicu i Rugvicu gdje je uočeno smanjenje uvjetovano izljevom otpadnih voda grada Zagreba, dok do oporavka dolazi na Lukavcu (Slika 27).



Slika 27. Grafički prikaz mjerenja prosječnog ubrzanja rakušaca nakon 24-satnog i 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Prosječno ubrzanje izraženo je u arbitrarnim pikselarnim jedinicama/s². Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Točkice predstavljaju vrijednosti koje odskaku (eng. *outlayers*). Statistički značajne razlike označene su simbolom (** za p < 0,01; *** za p < 0,001).

3.2.1.3. Stopa pokretljivosti – 24 h i 48 h

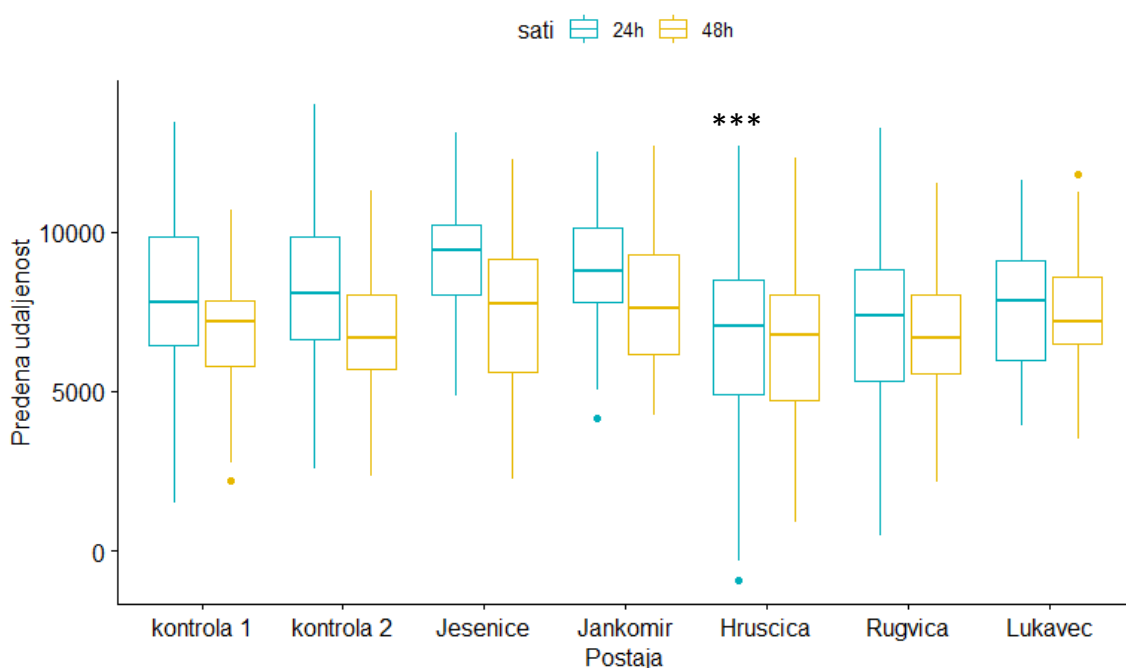
Na Slici 28. prikazana je stopa pokretljivosti rakušaca. Značajnije smanjenje stope pokretljivosti, u odnosu na kontrolu K1, uočeno je nakon 48 h kod jedinki koje su bile izložene vodi s postaje Jesenice, iako navedena smanjena stopa pokretljivosti nije bila statistički značajna. Na Jankomiru je, s druge strane, uočena visoka stopa pokretljivosti, odnosno povećanje i nakon 24 h i nakon 48 h u odnosu na kontrolu K1 (Slika 28).



Slika 28. Grafički prikaz stope pokretljivosti rakušaca nakon 24-satnog i 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Stopa pokretljivosti izražena je u %. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Točkice predstavljaju vrijednosti koje odskaču (eng. *outlayers*).

3.2.1.4. Ukupna prijeđena udaljenost – 24 h i 48 h

Na Slici 29. prikazana je ukupna prijeđena udaljenost. Nakon 24 h izlaganja, statistički značajno smanjenje prijeđene udaljenosti uočeno je na postaji Hrušćica ($5169,18 \pm 1637,27$) u odnosu na kontrolu K2 ($6102,40 \pm 1476,41$) ($p < 0,001$). Statistički značajno smanjenje prijeđene udaljenosti, nakon 24 h izlaganja, uočeno je na postajama Hrušćica i Rugvica u odnosu na postaje Jesenice i Jankomir te na postaji Lukavec u odnosu na Jesenice (sve sa statističkom značajnošću od $p < 0,001$). Statistički značajno smanjenje bilo je prisutno i nakon 48 h izlaganja na postaji Hrušćica u odnosu na Jankomir ($p < 0,001$) i Jesenice ($p < 0,01$). Prijеđena udaljenost bila je veća nakon 24 h u odnosu na 48 h. Najmanja i najveća prijeđena udaljenost uočene su nakon 24 h; najmanja na Hrušćici ($5169,18 \pm 1637,27$), a najveća na Jesenicama ($9263,13 \pm 1898,89$). Na Jesenicama i Jankomiru zabilježena je značajno veća prijeđena udaljenost u odnosu na Hrušćicu i Rugvicu gdje je uočena manja prijeđena udaljenost uvjetovana utjecajem izljeva otpadnih voda grada Zagreba (Slika 29).

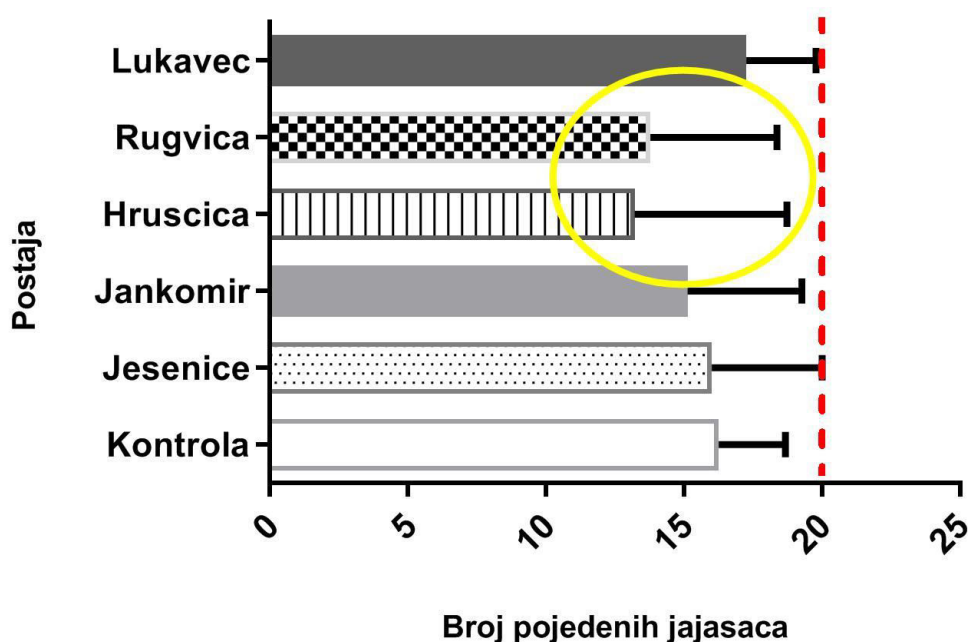


Slika 29. Grafički prikaz ukupne prijeđene udaljenosti rakušaca nakon 24-satnog i 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Prijеđena udaljenost izražena je u arbitrarnim pikselarnim jedinicama. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Točkice predstavljaju vrijednosti koje odskaču (eng. *outlayers*). Statistički značajne razlike označene su simbolom (***) za $p < 0,001$.

3.2.2. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja

Učinkovitost hranjenja, nakon 48-satnog izlaganja, mjerena je nakon 3 h i prikazana na Slici 30. Testom normalnosti ustanovljeno je da raspodjela podataka nije normalna kod svih postaja, odnosno, uočeno je kako postaje Jesenice i Jankomir nemaju normalnu raspodjelu.

Rezultati su predstavljeni kao sr.vr. \pm SD. Iako nema veće statističke značajnosti, kod svih je postaja, u odnosu na kontrolu ($16,25 \pm 2,42$), uočeno smanjenje učinkovitosti hranjenja, osim na postaji Lukavec ($17,25 \pm 2,54$) gdje je zabilježeno neznatno povećanje. U odnosu na kontrolu, podatci nisu statistički značajni, a prisutan je samo trend prema statističkoj značajnosti i to kod postaja Hrušćica ($p = 0.49$) i Rugvica ($p = 0.54$), na kojima su zabilježene najmanje vrijednosti (H: $13,21 \pm 5,52$; R: $13,78 \pm 4,58$) ovog parametra u odnosu na kontrolu ($16,25 \pm 2,42$), što je označeno žutom ovalnom oznakom (Slika 30).



Slika 30. Grafički prikaz učinkovitosti hranjenja rakušaca nakon 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Rezultati su predstavljeni kao sr.vr. \pm SD.

3.2.3. Biokemijski biomarkeri

Rezultati biokemijskih biomarkera izraženi su u odnosu na svježu masu jedinke (eng. *fresh weight*, FW) (Tablica 6) ili na ukupne proteine.

Tablica 6. Masa i spol jedinke korištenih za mjerenje biokemijskih biomarkera.

Red. br.	JESENICE		JANKOMIR		HRUŠĆICA		RUGVICA		LUKAVEC	
	Spol	Masa (mg)	Spol	Masa (mg)	Spol	Masa (mg)	Spol	Masa (mg)	Spol	Masa (mg)
1	M	29,9	M	17,1	M	12,4	M	15,7	M	22,0
2	M	22,6	M	21,7	Ž	10,1	M	9,8	M	15,7
3	M	31,1	M	15,9	M	13,7	Ž	9,5	M	17,4
4	M	26,1	M	17,0	M	20,3	M	19,8	M	21,3
5	M	28,7	M	18,9	M	13,2	M	17,4	M	28,6
6	M	22,5	M	21,1	M	10,3	M	12,4	M	16,6
7	M	31,0	M	18,3	M	24,3	M	12,8	M	15,8
8	M	21,7	Ž	23,3	M	8,6	M	13,4	M	19,0
9	M	20,5	M	23,8	M	31,6	M	24,7	M	18,6
10	M	26,6	Ž	17,8	Ž	14,3	M	9,4	M	19,7
11	M	26,4	M	20,9	M	22,8	Ž	18,0	M	22,8
12	M	24,7	M	16,5	M	25,4	M	29,0	M	20,0
13	M	21,6	M	21,7	Ž	12,7	M	25,8	M	17,0
14	M	26,2	M	16,3	M	19,4	M	14,3	M	18,6
15	M	20,0	M	17,7	M	12,7	Ž	18,6	M	17,3
16	M	24,1	M	13,4	M	19,4	M	18,0	M	18,5
17	M	18,9	M	23,7	M	20,1	M	19,2	M	30,0
18	M	22,1	M	19,2	M	13,4	M	12,2	M	21,8
19	M	27,4	M	17,4	M	12,1	M	21,2	M	21,6
20	M	17,6	M	14,7	M	27,2	M	16,7	M	24,8
21	M	25,0	M	19,6	M	11,7	M	9,1	M	21,9
22	M	27,9	M	20,0	M	11,0	M	17,0	M	21,9
23	M	32,6	M	17,3	M	12,7	M	16,9	M	23,3
24	M	23,7	M	22,3	M	19,5	M	25,9	M	26,2
25	M	26,6	M	24,0	Ž	15,0	M	15,0	M	19,5
26	M	24,0	M	23,2	M	16,1	M	17,9	M	17,7
27	M	34,4	M	21,0	M	22,1	M	28,9	M	30,5
28	M	38,7	M	13,7	M	18,8	M	12,7	M	30,7
29	M	23,2	M	21,3	Ž	16,9	M	12,4	M	22,4
30	M	29,2	M	15,6	M	18,4	M	11,7	M	20,5
31	M	27,3	M	24,6	Ž	10,2	M	21,6	M	20,5
32	M	29,8	M	19,6	Ž	17,1	M	14,7	M	24,6
33	M	31,5	M	25,2	M	22,5	M	19,7	M	21,7
34	M	20,7	/	/	M	30,1	M	10,9	M	18,3
35	/	/	/	/	Ž	18,7	/	/	M	22,6
36	/	/	/	/	M	11,2	/	/	M	26,1

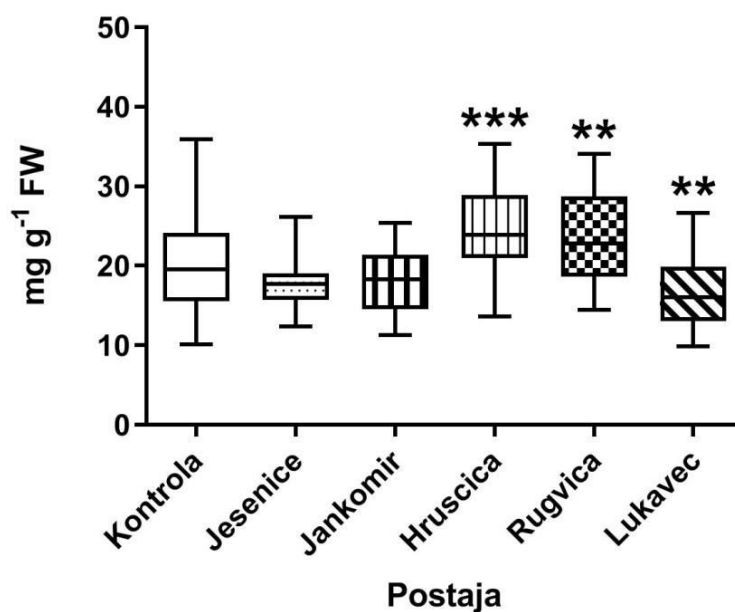
Tablica 6. Masa i spol jedinki korištenih za mjerenje biokemijskih biomarkera. Nastavak tablice.

Red.br.	Kontrola 1		Kontrola 2	
	Spol	Masa (mg)	Spol	Masa (mg)
1	M	20,8	M	21,2
2	M	21,7	M	28,8
3	M	19,7	M	9,3
4	M	22,1	M	21,3
5	M	22,3	Ž	15,4
6	M	19,7	M	15,3
7	M	22,4	M	19,3
8	M	16,3	M	18,7
9	M	16,5	M	18,6
10	M	23,6	M	20,6
11	M	19,7	M	13,2
12	M	21,5	M	18,8
13	M	26,1	M	14,0
14	M	20,7	M	17,6
15	M	24,8	M	23,1
16	M	19,7	M	24,0
17	M	22,9	M	24,9
18	M	20,0	Ž	19,7
19	M	23,8	M	13,9
20	M	17,2	M	13,3
21	M	19,0	M	20,3
22	M	20,2	M	14,6
23	M	21,2	M	16,5
24	M	21,2	M	22,1
25	M	23,0	M	19,4
26	M	21,4	M	20,3
27	M	18,4	M	17,5
28	M	27,7	M	23,6
29	M	22,5	M	21,6
30	M	17,9	M	21,9
31	M	27,5	M	21,8
32	M	17,8	M	20,3
33	M	23,7	M	19,6
34	M	23,5	M	22,8
35	M	26,9	M	23,7
36	M	23,5	M	18,5

3.2.3.1. Ukupni proteini

Rezultati mjerenja ukupnih proteina nakon 48-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 31. Testom normalnosti ustanovljena je normalna raspodjela kod svih podataka sa svih postaja. Statistička značajnost u usporedbi svake pojedine postaje s kontrolom naznačena je na Slici 31.

Statistički značajno povećanje ukupnih proteina, u odnosu na kontrolu ($19,85 \pm 5,38$), uočeno je kod rakušaca izlaganih vodi s postaja Hrušćica ($24,66 \pm 5,33$) i Rugvica ($23,33 \pm 5,46$). Na svim drugim postaja zabilježeno je smanjenje, a statistički značajno smanjenje ukupnih proteina, u odnosu na kontrolu, primijećeno je na postaji Lukavec ($16,40 \pm 4,15$). Statistički značajno povećanje ukupnih proteina uočeno je na postajama Rugvica i Hrušćica u odnosu na Jesenice, Lukavec i Jankomir (sve sa statističkom značajnošću od $p < 0,001$). Najmanja vrijednost zabilježena je na postaji Lukavec, a najveća na postaji Hrušćica (Slika 31).

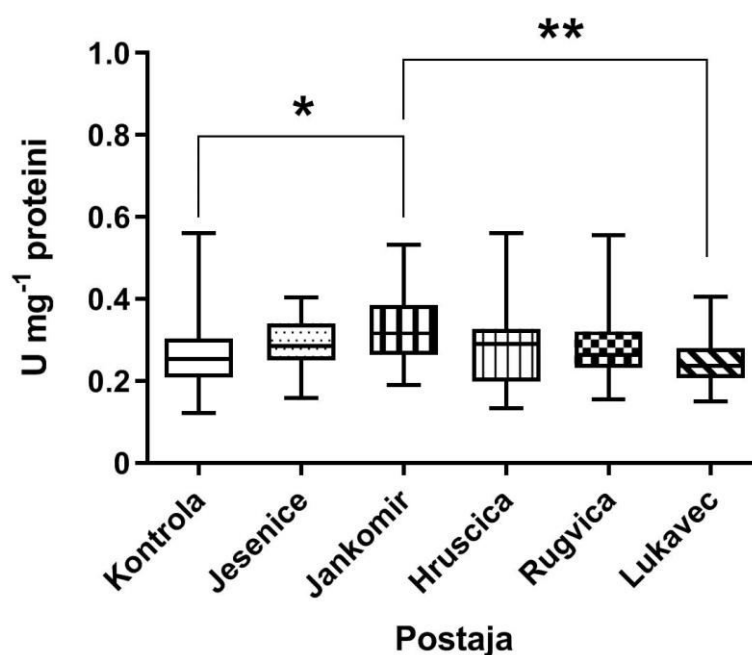


Slika 31. Grafički prikaz mjerenja ukupnih proteina nakon 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Statistički značajne razlike između kontrole i postaja označene su simbolom (** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$).

3.2.3.2. Mjerenje aktivnosti glutation-S-transferaze

Rezultati mjerenja glutation-S-transferaze nakon 48-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 32. Testom normalnosti ustanovljeno je da raspodjela podataka nije normalna kod svih postaja, odnosno, uočeno je kako kontrola i postaja Rugvica nemaju normalnu raspodjelu.

Statistički značajno povećanje GST aktivnosti, u odnosu na kontrolu ($0,27 \pm 0,087$), uočeno je na postaji Jankomir ($0,33 \pm 0,086$). Iako nije statistički značajno, kod svih je drugih postaja zabilježeno povećanje, osim na postaji Lukavec ($0,25 \pm 0,057$) gdje zabilježeno smanjenje u odnosu na kontrolu. Statistički značajno povećanje uočeno je također na postaji Jankomir u odnosu na Lukavec ($p < 0,01$), a upravo su na tim dvjema postajama zabilježene najmanja (Lukavec) i najveća (Jankomir) vrijednost (Slika 32).

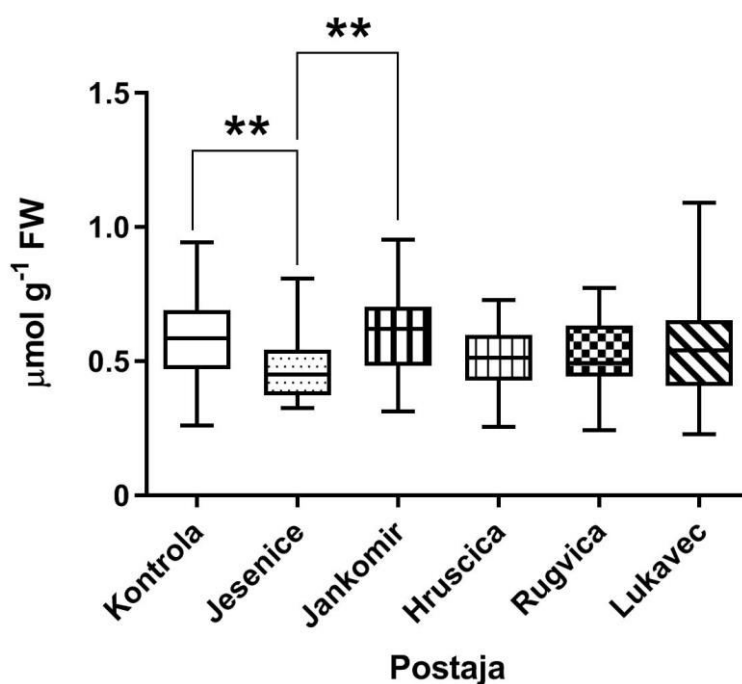


Slika 32. Grafički prikaz mjerenja GST nakon 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Statistički značajne razlike označene su simbolom (* za $p < 0,05$; ** za $p < 0,01$).

3.2.3.3. Određivanje sadržaja malondialdehida

Rezultati mjerenja malondialdehida nakon 48-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 33. Testom normalnosti ustanovljena je normalna raspodjela kod svih podataka svih postaja.

Statistički značajno smanjenje MDA, u odnosu na kontrolu ($0,59 \pm 0,15$), uočeno je na postaji Jesenice ($0,47 \pm 0,11$). Iako nema statističke značajnosti, kod svih je drugih postaja također zabilježeno smanjenje, osim na postaji Jankomir ($0,61 \pm 0,16$) gdje zabilježeno blago povećanje u odnosu na kontrolu. Statistički značajno povećanje uočeno je na Jankomiru u odnosu na Jesenice ($p < 0,01$), a upravo su na tim dvjema postajama zabilježene najmanja (Jesenice) i najveća (Jankomir) vrijednost (Slika 33).

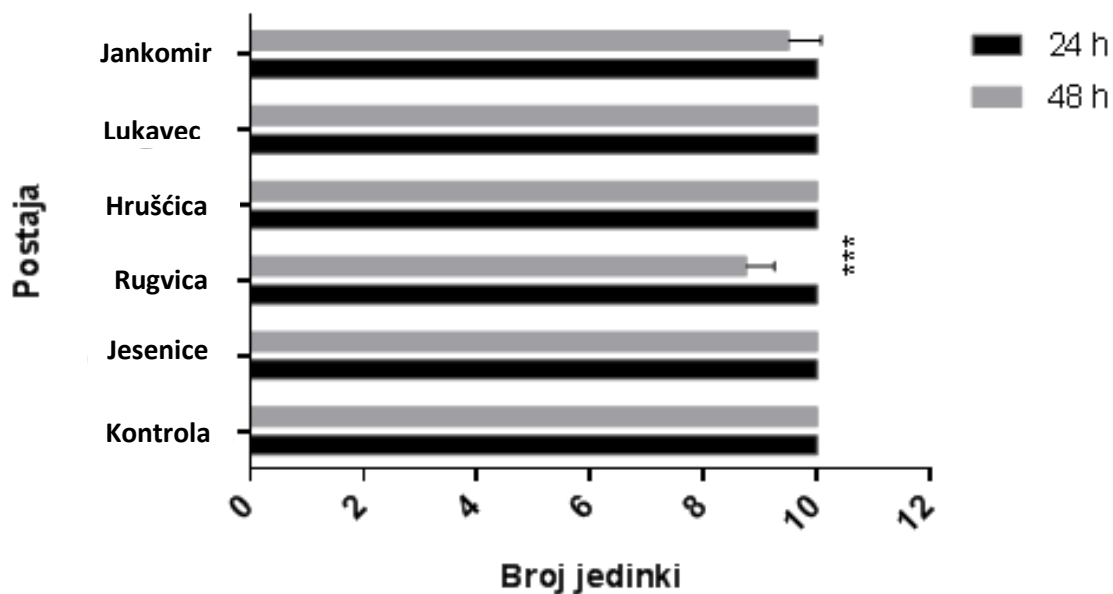


Slika 33. Grafički prikaz mjerenja MDA nakon 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Statistički značajne razlike označene su simbolom (** za $p < 0,01$).

3.3. *Daphnia magna*: akutni imobilizacijski test

3.3.1. Imobilizacijski test

Nakon 24 h sve su jedinke bile žive, a nakon 48 h uočen je manji utjecaj uzorkovane vode s postaje Jankomir (5 %), dok je na Rugvici (12,5 %) zabilježen statistički značajan utjecaj na preživljavanje odnosno smrtnost vodenbuha ($p < 0,001$) (Slika 34).



Slika 34. Grafički prikaz smrtnosti vodenbuha nakon 24 h i 48 h izlaganja. Rezultati su predstavljeni kao sr.vr. \pm SD. Statistički značajne razlike označene su simbolom (***) za $p < 0,001$.

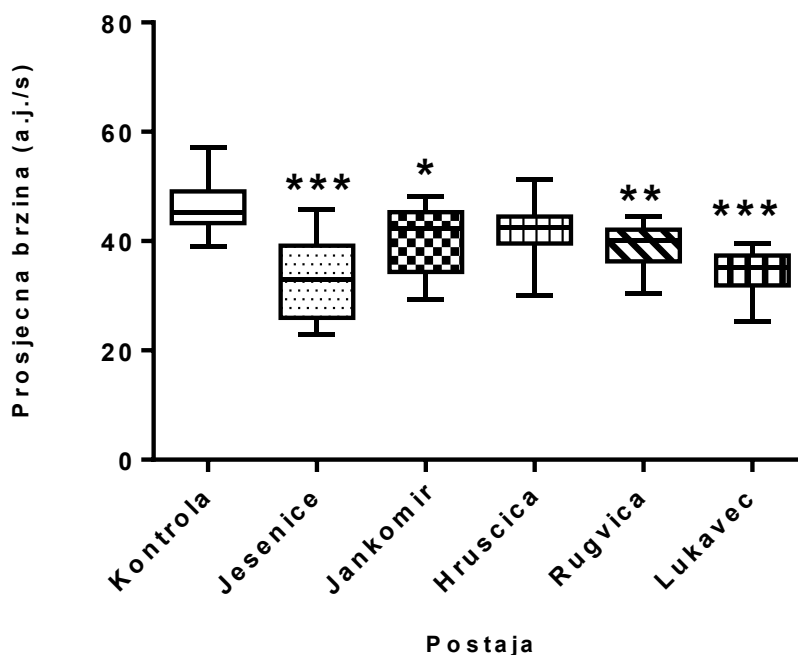
3.3.2. Analiza kretanja

Statistička značajnost (* za $p < 0,05$; ** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$) na grafu naznačena je samo u usporedbi pojedine postaje s kontrolom.

3.3.2.1. Prosječna brzina – 24h

Rezultati mjerenja prosječne brzine nakon 24-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 35. Testom normalnosti ustanovljena je normalna raspodjela kod svih podataka svih postaja.

Statistički značajno smanjenje prosječne brzine kretanja vodenbuha, u odnosu na kontrolu ($46,36 \pm 4,78$), uočeno je kod svih postaja osim Hrušćice, na kojoj je također zabilježeno smanjenje prosječne brzine, ali nije statistički značajno. Statistički najznačajnije razlike, a ujedno i najmanje vrijednosti za ovaj parametar, zabilježene su na postajama Jesenice ($33,02 \pm 7,46$) te Lukavec ($34,10 \pm 4,09$) (Slika 35).

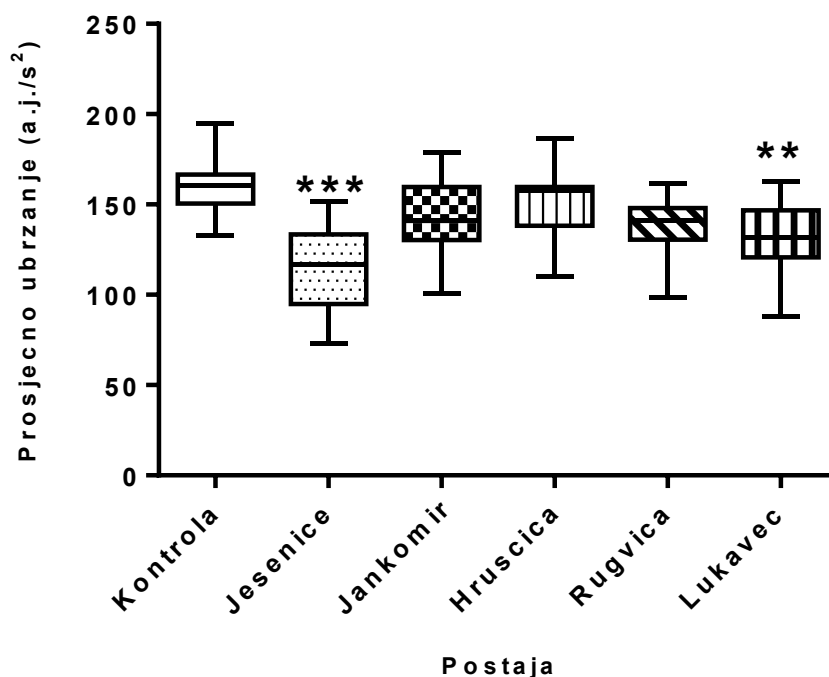


Slika 35. Grafički prikaz mjerenja prosječne brzine vodenbuha nakon 24-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Prosječna brzina kretanja izražena je u arbitrarnim pikselarnim jedinicama/s. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Statistički značajne razlike označene su simbolom (* za $p < 0,05$; ** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$).

3.3.2.2. Prosječno ubrzanje – 24h

Rezultati mjerenja prosječnog ubrzanja vodenbuha nakon 24-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 36. Testom normalnosti ustanovljeno je da raspodjela podataka nije normalna kod svih postaja, odnosno, uočeno je kako postaja Rugvica nema normalnu raspodjelu.

Statistički značajno smanjenje prosječnog ubrzanja, u odnosu na kontrolu ($160,3 \pm 15,37$), uočeno je na postajama Jesenice ($114,9 \pm 23,92$) i Lukavec ($131,2 \pm 19,10$), a iako nije bilo statistički značajno, na svim je drugim postajama također uočeno smanjenje. Najmanja zabilježena vrijednost, u odnosu na kontrolu, bila je vrijednost na postaji Jesenice (Slika 36).

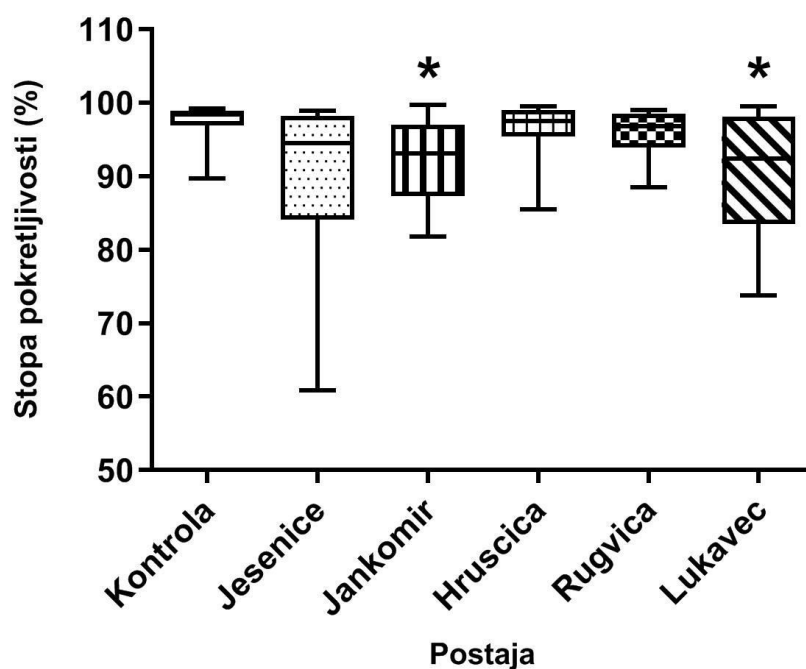


Slika 36. Grafički prikaz mjerenja prosječnog ubrzanja vodenbuha nakon 24-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Prosječno ubrzanje izraženo je u arbitrarnim pikselarnim jedinicama/s². Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Statistički značajne razlike označene su simbolom (** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$).

3.3.2.3. Stopa pokretljivosti – 24h

Rezultati mjerenja stope pokretljivosti nakon 24-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 37. Testom normalnosti ustanovljeno je da raspodjela podataka nije normalna kod svih postaja, odnosno, uočeno je kako kontrola te postaje Jesenice, Hrušćica i Rugvica nemaju normalnu raspodjelu.

Statistički značajno smanjenje stope pokretljivosti, u odnosu na kontrolu ($97,36 \pm 2,70$), uočeno je na postajama Jankomir ($92,05 \pm 5,795$) i Lukavec ($90,27 \pm 8,37$). Iako nije statistički značajno, smanjenje je zabilježeno i na ostalim postajama. Najmanja zabilježena vrijednost, u odnosu na kontrolu, bila je na postaji Jesenice ($90,17 \pm 11,62$) no zbog visoke SD i rasapa podataka nije statistički značajno (Slika 37).

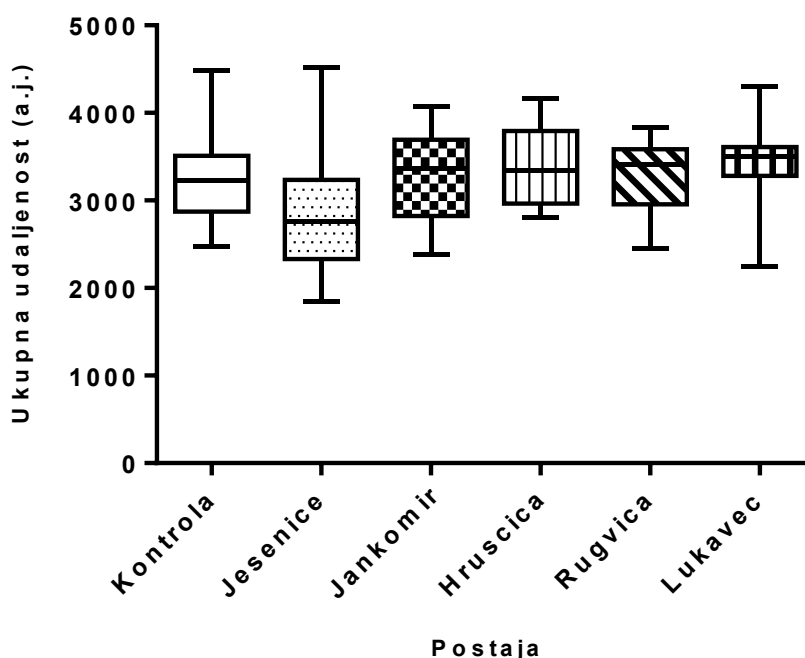


Slika 37. Grafički prikaz mjerenja stope pokretljivosti vodenbuha nakon 24-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju. Statistički značajne razlike označene su simbolom (* za $p < 0,05$).

3.3.2.4. Ukupna prijeđena udaljenost – 24h

Rezultati mjerenja ukupne prijeđene udaljenosti nakon 24-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save prikazani su na Slici 38. Testom normalnosti ustanovljena je normalna raspodjela kod svih podataka svih postaja.

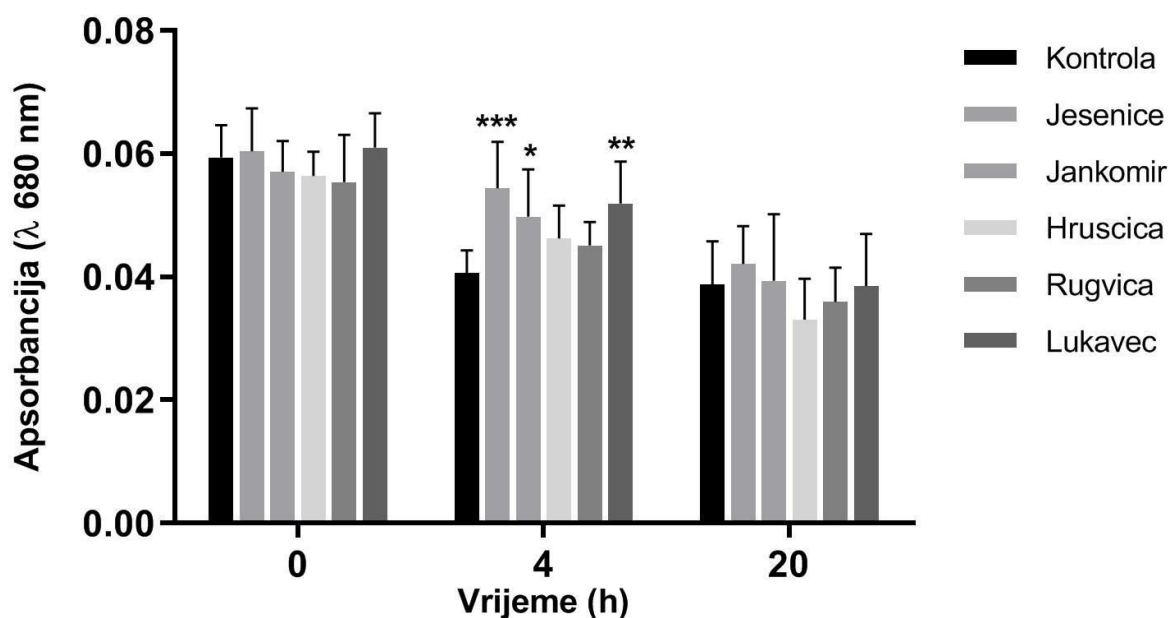
Iako nisu zabilježene statistički značajne razlike, u odnosu na kontrolu, povećanje ukupne prijeđene udaljenosti uočeno je na svim postajama osim na postaji Jesenice gdje je bilo prisutno smanjenje, no ono nije statistički značajno zbog velike SD. Najmanja vrijednost ovog parametra zabilježena je na postaji Jesenice ($2945 \pm 836,9$), a najveća na postaji Lukavec ($3414 \pm 554,8$), u odnosu na kontrolu ($3235 \pm 548,6$) (Slika 38).



Slika 38. Grafički prikaz ukupne prijeđene udaljenosti vodenbuha nakon 24-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Prosječno ubrzanje izraženo je u arbitrarnim pikselarnim jedinicama. Rezultati su predstavljeni kutijastim dijagramom gdje pravokutnik prikazuje podatke donjeg i gornjeg kvartila, crta pravokutnika označava medijan, dok su donje i gornje vertikalne linije najmanji i najveći dobiveni rezultat za tu postaju.

3.3.3. Test učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja

Rezultati testa učinkovitosti hranjenja algom *Chlorella vulgaris*, nakon 48-satnog izlaganja uzorcima rijeke Save, prikazani su na Slici 39. Koncentracija algi, odnosno apsorbancija pri 680 nm, mjerena je nakon 0 h, 4 h i 20 h. Na svim je postajama i nakon 4 h i nakon 20 h primijećeno smanjenje apsorbancije odnosno povećano hranjenje. Statistički značajne razlike, u odnosu na kontrolu, uočene su nakon 4 h na postajama Jesenice, Jankomir i Lukavec na kojima je uočena najmanja učinkovitost hranjenja u odnosu na kontrolu. Na Jesenicama je zabilježen najmanji pad apsorbancije odnosno najmanja stopa hranjenja. Nakon 20 h na Hrušćici i Rugvici uočena je viša stopa hranjenja u odnosu na kontrolu (Slika 39).



Slika 39. Grafički prikaz učinkovitosti hranjenja vodenbuha nakon 48-satnog izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Rezultati su predstavljeni kao sr.vr. \pm SD. Statistički značajne razlike označene su simbolom (* za $p < 0,05$; ** za $p < 0,01$; *** za $p < 0,001$).

4. RASPRAVA

Onečišćivala iz različitih izvora, kao što su industrijske ili tehnološke otpadne vode, nepročišćene komunalne vode iz domaćinstava te onečišćivala iz poljoprivrednih djelatnosti, završavaju u rijeci Savi (Källqvist i sur., 2008; Ščančar i sur., 2015). S obzirom na važnu ulogu porječja rijeke Save u opskrbi pitkom vodom, javlja se nužna potreba za stalnim i temeljitim monitoringom kvalitete vode (Källqvist i sur., 2008). Cilj ovog rada je utvrđivanje razine organskog onečišćenja rijeke Save kao i utjecaj tog onečišćenja na izabrane modelne organizme putem akutnih testova toksičnosti u kombinaciji s mjerenjem biokemijskih pokazatelja (sadržaj proteina i malondialdehida, aktivnost enzima glutation-S-transferaze) te analizama kretanja i učinkovitosti hranjenja.

Za procjenu utjecaja onečišćivala na vodene organizme nije dovoljna samo kemijska karakterizacija vode, koja daje informaciju o prisutnosti i koncentraciji toksikanata u ekosustavu, već je bitna stvarna izloženost organizama prisutnim toksikantima (Jha, 2004), a ona ovisi i o bioraspoloživosti, procesima transformacije i razgradnje te međudjelovanjima između različitih kemijskih spojeva. Povezanost između izloženosti onečišćivalima i njihovih bioloških učinaka nije uvijek značajna (Kleijnans i van Schooten, 2002), a da bi se pružila što točnija procjena ukupnog utjecaja organskog onečišćenja na vodeni okoliš i žive organizme u njemu, primijenjuju se biološki testovi s različitim vrstama i s većim brojem jedinki.

Akutni testovi toksičnosti osnova su ekotoksikoloških istraživanja. Kako bi se utvrdio utjecaj onečišćenja na žive organizme korišteni su biotestovi s modelnim organizmima iz skupine rakova (Crustacea), a modelni organizmi odabrani za ovaj rad pokazali su različitu osjetljivost na različite uzorke voda s drugačijim sastavom onečišćivala. Uzrok tome može biti činjenica da različiti modelni organizmi mogu biti izloženi toksikantima na drugačiji način zbog svojih bioloških i ekoloških svojstava (Schulze-Sylvester i sur., 2016). Za vrstu *Daphnia magna* je dokazano da je jedna od najosjetljivijih vrsta na različite oblike onečišćenje (Oropesa i sur., 2017).

4.1. Kemijska karakterizacija vode

Kako bi se odredio stupanj antropogenog onečišćenja organskim onečišćivalima u uzorkovanoj vodi, u laboratoriju Hrvatskih voda učinjena je kemijska karakterizacija vode tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti spregnutom spektrometrijom masa (UHPLC/QTOF/MS) i određen je niz prisutnih OO. Pomalo iznenađujuće, najveći broj različitih OO utvrđen je u uzorku vode s postaje Jesenice, zatim s postaja Hrušćica, Rugvica, Lukavec i na kraju s postaje Jankomir. Uzevši u obzir ukupnu koncentraciju ispitivanih onečišćivala te organsko opterećenje vode, redosljed postaja je logičniji: Hrušćica > Rugvica > Jesenice > Lukavec > Jankomir. Postaja Jesenice (13,27 ng/L) bila je onečišćena više nego što se očekivalo, a visoke ukupne koncentracije organskih onečišćivala na postajama Hrušćica (14,98 ng/L) i Rugvica (13,57 ng/L) bile su u skladu s predviđanjima, budući da je voda s postaje Hrušćica bila uzorkovana stotinjak metara nizvodno od ispusta glavnog odvodnog kanala uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, a postaja Rugvica nalazi se 10 km nizvodno od postaje Hrušćica. Na postajama Hrušćica i Rugvica, koje primaju otpadne vode urbanog područja, farmaceutici čine 70% odnosno 75% od ukupnih zabilježenih OO. Na postaji Jesenice zabilježen je najveći broj nađenih onečišćivala (398/483), a skupine koje su dominirale u podjednakim koncentracijama bile su farmaceutici (6,32 ng/L) te industrijske kemikalije (5,12 ng/L) koje su upravo na ovoj postaji i pronađene u najvećoj koncentraciji indicirajući utjecaj industrije iz susjednih zapadnih država. Tome je doprinijela iznimno visoka koncentracija 4-para-nonilfenola (3,52 ng/L) koja čini skoro 70% od svih zabilježenih industrijskih kemikalija na postaji Jesenice, a koja upućuje na velik utjecaj kemijske industrije.

Broj medicinskih, poljoprivrednih i industrijskih kemikalija ubrzano raste s razvojem modernog društva (Livingstone i sur., 2000). Kontinuirano ispuštanje lijekova u kopnene vode rezultira kroničnim izlaganjem vodenih organizama tim spojevima i negativnim utjecajem na cjelokupan vodeni ekosustav. Koncentracije tih spojeva u površinskim vodama su u ng/L i vjerojatno neće imati izravni letalni učinak na organizme, ali dugotrajno izlaganje niskim koncentracijama vodi do subletalnih učinaka poput promjena u ponašanju (De Lange i sur., 2006) koje mogu imati utjecaj na uspješnost u razmnožavanju ili pri bijegu od predatora što dugoročno može utjecati na smanjenje brojnosti populacije. Odlaganje velikih količina organskih i hranjivih tvari te raznih onečišćivala može rezultirati, primjerice, eutrofikacijom vodenog okoliša koja dalje negativno utječe na biološku komponentu prisutnu u tako ugroženom okolišu (Livingstone i sur., 2000; Topić Popović i sur., 2015). Bentički

beskralježnjaci i drugi vodeni organizmi mogu akumulirati toksične tvari prvenstveno iz vode, ali i iz sedimenta (Gross-Sorokin i sur., 2003), a ako te organizme pojede npr. riba, onečišćivala se mogu prenijeti kroz hranidbeni lanac sve do ljudi (Babić i sur., 2017; Hafner i sur., 2015).

Dokazano je da farmaceutici uzrokuju povećanu smrtnost riba, smanjuju raznolikost planktona, inhibiraju rast cijanobakterija i mnogih vodenih biljaka (Reinhold i sur., 2010). U Republici Hrvatskoj sustavno i cjelovito praćenje ukupne potrošnje lijekova na razini cijele države provodi se od 2004. godine. Prema izvještaju Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) o korištenju lijekova od 2005. do 2017. godine, u Hrvatskoj je u prošlom desetljeću došlo do povećanja upotrebe farmaceutika za oko 60% (HALMED, 2018). Sukladno tome, ukupna koncentracija mjerenih farmaceutika u uzorcima vode rijeke Save bila je bitno viša u odnosu na sve ostale skupine organskih onečišćivala, a to je vjerojatno trend i u većini razvijenih država. Najviše koncentracije farmaceutika izmjerene su u uzorcima voda s postaja Hrušćica i Rugvica koje su najvećim dijelom pod utjecajem otpadnih voda grada Zagreba (Babić i sur., 2018). Pretpostavlja se da su povišene koncentracije farmaceutika na tim postajama potrošačke prirode, što dokazuje i njihov položaj u blizini uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, a u oba su uzorka vode antibiotici te halucinogeni/stimulansi/droge bile najdominantnije zabilježene podskupine farmaceutika. Budući da su uzorci uzeti u svibnju, visoke koncentracije antibiotika mogle bi biti posljedica povećane upotrebe tijekom zimskih mjeseci kada se navedeni lijekovi najviše i koriste. Danas sve više raste zabrinutost zbog spore razgradnje i postojanosti farmaceutika u okolišu (Christen i sur., 2010), a njihovi najvažniji izvori su uređaji za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda, bolnice te farmaceutska postrojenja (Bielen i sur., 2017). Broj vrsta farmaceutika koji je utvrđen u ovom istraživanju niži je od broja vrsta pesticida u svakom uzorku, ali je uočeno da je svaki uzorak sadržavao 5 – 8 puta veću koncentraciju farmaceutika nego pesticida (Babić i sur., 2018). Niske koncentracije zabilježenih pesticida mogle bi biti povezane sa sezonalnošću upotrebe pesticida jer su uzorci uzeti u rano proljeće, a za vrijeme zime korištenje pesticida relativno je smanjeno (Babić i sur., 2018).

Podskupine farmaceutika zabilježene u vodi u najvišim koncentracijama bile su: halucinogeni/stimulansi/droge, antibiotici, analgetici, hipnotici/antikonvulzanti/anestetici, steroidni protuupalni lijekovi te kardiovaskularni lijekovi. Nekoliko vrsta farmaceutika pronađeno je na gotovo svim postajama u visokim koncentracijama. Antibiotik nafcilin zabilježen je na svim uzorkovanim postajama, a najveća koncentracija uočena je na postaji

Jesenice (0,52 ng/L; 4 – 27 puta viša koncentracija nego na ostalim postajama), dok je amoksicilin u najvećoj koncentraciji zabilježen na Hrušćici (0,96 ng/L; 1,7 do čak 95 puta viša koncentracija u odnosu na ostale postaje). Tetraciklin HCl u povišenim je koncentracijama zabilježen na Hrušćici (0,68 ng/L) i Rugvici (0,67 ng/L). Gorokhova i sur. (2015) su izvijestili da antibiotici mogu utjecati na neciljane vrste i dovesti do smanjenja stope hranjenja i posljedično smanjene stope rasta. Tuc Dinh i sur. (2011) su u francuskim rijekama Seine i Prédecelle zabilježili koncentraciju amoksicilina od 68 ng/L i tetraciklina od 7,4 ng/L. Kardiovaskularni lijek metoprolol također je zabilježen na svim postajama, a povišena koncentracija bila je uočena na Hrušćici (1,21 ng/L). Metoprolol je beta-blokator koji se u visokim koncentracijama nalazi i u vodama Italije (10 – 100 ng/L) (Aukidy i sur., 2012). Hipnotik fenobarbital uočen je na svim postajama osim na Jesenicama, a koncentracija je varirala između 0,25 ng/L na Jankomiru do 1,29 ng/L na Rugvici. Analgetici acetilsalicilna kiselina i ibuprofen zabilježeni su na svim postajama, osim na Jankomiru. Ovi analgetici utječu na ponašanje vodenih beskralježnjaka tako što i u vrlo niskim koncentracijama značajno smanjuju aktivnost kretanja (De Lange i sur., 2006). Na postaji Jesenice ističe se i podskupina steroidni protuupalni lijekovi na kojoj je zabilježen fludrokortizon acetat u koncentraciji od 0,79 ng/L. Stimulansi kofein, nikotin i kotinin (metabolit nikotina) također su zapaženi u svim uzorcima vode. Visoke koncentracije nikotina u vodenim ekosustavima potiču zabrinutost jer nikotin može izazvati promjene u nekim ključnim skupinama različitih trofičkih razina što može dovesti do poremećaja ravnoteže vodenog ekosustava u vrlo kratkom vremenu (Oropesa i sur., 2017). Istraživanja pokazuju da nikotin može imati negativan utjecaj na reproduktivni sustav planktonskih rakova *Daphnia magna* na način da smanjuje polaganje jaja i broj izleglih mladunaca te djeluje na njihov endokrini sustav jer potiče pojavljivanje muških jedinki (Oropesa i sur., 2017). Poznato je, nadalje, da je nikotin toksičan za kukce (koji zajedno s rakovima pripadaju člankonošcima) i da se u prošlosti naširoko koristio kao prirodan insekticid protiv lisnih uši i moljaca na nizu usjeva. Nikotin se nalazi u velikom broju sintetičkih neonikotinoidnih insekticida, a ometa neurotransmitere koji šalju poruke mišićima pa može utjecati i na smanjenje pokretljivosti kod kukaca odnosno rakova (Buerge i sur., 2008). Legradi i sur. (2018) su nikotin, kotinin i kofein definirali kao spojeve s neuroaktivnim djelovanjem. Najviše koncentracije nikotina uočene su na postajama Rugvica i Jankomir, povećana koncentracija kotinina na Lukavcu, dok su više koncentracije kofeina zabilježene na Rugvici, Hrušćici i Lukavcu.

Industrijske kemikalije bile su drugi najdominantniji izvor onečišćenja. Najviše pronađene koncentracije bile su koncentracije 4-para-nonilfenola, bisfenola A, NP1EO, NP2EO, OP2EO te 4-terc-oktilfenola. Koncentracije alkil fenola i bisfenola A u svim su uzorcima vode bile višestruko povećane u odnosu na perfluoroalkilne i polifluoroalkilne spojeve. Ti svi spojevi predstavljaju veliku opasnost jer su široko zastupljeni u proizvodnji deterdženata i PET ambalaže, a dokazano je da djeluju kao endokrini modulatori (Bonefeld-Jørgensen i sur., 2007; Gatidou i sur., 2007), što mi nažalost nismo mogli utvrditi u ovom istraživanju. Najviša koncentracija pojedinog onečišćivača izmjerena je za 4-para-nonilfenol – 3,52 ng/L na postaji Jesenice (7 – 10,5 puta viša koncentracija nego na ostalim postajama). U radu Gautam i sur. (2015) u indijskim su rijekama (Ganges i Varuna) zabilježene koncentracije 4-para-nonilfenola varirale između 3,90 i 16 µg/L. 4-para-nonilfenol nastaje kao proizvod biorazgradnje alkilfenol etoksilata koji se široko koriste kao neionski surfaktanti (površinski aktivne tvari) (Renner, 1997). Hidrofoban je i vrlo postojan spoj koji se oslobađa iz plastike i ima sposobnost akumuliranja u živim organizmima. Također je sveprisutan ksenoestrogen koji izaziva endokrine poremećaje (Litwa i sur., 2014; Gross-Sorokin i sur., 2003), a otkriven je u površinskim i podzemnim vodama, otpadnim vodama, sedimentima, vodenim organizmima te zraku i hrani (Porter i Hayden, 2002). Zbog svoje lipofilne prirode akumulira se i postojan je u vodenim organizmima te kroz prehrambeni lanac dolazi i do ljudi (Gautam i sur., 2015). Testom bioakumulacije utvrđeno je da se bioakumulacija 4-para-nonilfenola povećava kako se sadržaj organske tvari u sedimentu smanjuje pa se pretpostavlja da kemijsko vezanje za organski materijal smanjuje kemijsku bioraspodivnost (Mäenpää i Kukkonen, 2006). Toksičan je za vodene organizme kao što su bakterije, alge, beskralježnjaci i ribe. Uzrokuje brojne štetne učinke u ribama: smanjuje oplodnju i rast, remeti endokrini sustav, a estrogena svojstva ometaju normalnu spolnu diferencijaciju i reproduktivne aktivnosti u ribama (Chaube i sur., 2013; Hill i Janz, 2003). Zabilježene letalne koncentracije za ribe su u rasponu od 17 do 3000 µg/L (Servos, 1999). 4-para-nonilfenol ima subletalni učinak na rast vodenih kukaca, smanjujući veličinu i masu ličinki (Mäenpää i Kukkonen, 2006), a u radu Granmo i sur. (1991) na dagnji su uočeni subletalni učinci u vidu smanjenja rasta te snage bisusnih niti. BPA je zabilježen u najvišoj koncentraciji na Rugvici (0,48 ng/L) i Jesenicama (0,41 ng/L), dok je na svim ostalim postajama koncentracija bila do 7 puta niža. Najviše koncentracije BPA u svijetu zabilježene su u Aziji i Europi i kreću se između 0,006 ng/L i 370 µg/L, a u tkivu riba variraju između 0,2 i 13 000 ng/g (Corrales i sur., 2015). Lindholst i sur. (2003) su pokazali da zebrice brzo metaboliziraju BPA što se može pripisati nižoj estrogenskoj osjetljivosti na BPA. Bhandari i sur. (2015) su otkrili da budući naraštaji

riba pokazuju smanjenu stopu oplodnje i povećanu smrtnost embrija, a ako se ti trendovi nastave, može se očekivati da će doći do smanjenja ukupne populacije budućih naraštaja koji su vremenski daleko od početne izloženosti bisfenolu A. BPA pokazuje estrogensku aktivnost, dok alkilfenol etoksilati djeluju kao endokrini modulatori (Amiridou i Voutsas, 2011).

U uzorcima vode prisutan je bio i velik broj pesticida: Jesenice > Rugvica > Hrušćica > Lukavec > Jankomir. Velik broj pesticida se i očekivao zbog intenzivnih poljoprivrednih aktivnosti na područjima duž rijeke Save. Iako je brojnost vrsta pesticida najveća, koncentracije su bile puno niže u usporedbi s farmaceuticima i industrijskim kemikalijama, a to se može objasniti vremenom uzorkovanja vode. Zbog toga su na svakoj postaji bile zabilježene relativno niske koncentracije pesticida. U skupini pesticida najbrojniji su bili insekticidi moksidektin, spiromesifen te halofenozid, zatim herbicidi, od kojih su u nešto višim koncentracijama zabilježeni fenmedifam, nikosulfuron, rimsulfuron, glifosat te terbutilazin i na kraju fungicidi tolilfluanid, flutolanin i famoksadon. Na postaji Jankomir gotovo jednako su bili zastupljeni herbicidi i insekticidi (44,97 % i 45,38 %), kao i na postaji Hrušćica (36,01 % i 39,53 %), dok su na Jesenicama, Rugvici i Lukavcu najdominantnija podskupina bili insekticidi (61,21 %; 51,18 %; 55,69 %). Fungicidi na svim postajama čine manje od 25% zabilježenih pesticida. U istraživanju Legradi i sur. (2018) o neurotoksičnim spojevima, na dvjema europskim rijekama, Rajni i Dunavu, utvrđeno je da je olfaktorni sustav riba posebno osjetljiv i ranjiv na neurotoksične tvari poput pesticida i surfaktanata. Olfaktorni sustav je u direktnom dodiru s onečišćenom vodom, a navedeni spojevi dovode do smanjenja ili izostanka osjetila njuha (Legradi i sur., 2018).

Skupine hormoni i „ostalo“ pojavile su se u nižim koncentracijama u svim uzorcima vode. To je i očekivano s obzirom da je u ove dvije skupine detektirano malo vrsta spojeva (8 vrsta hormona i 7 vrsta iz skupine „ostalo“) u odnosu na primjerice skupinu pesticida gdje je broj detektiranih vrsta daleko veći (242), a koncentracije nisu bile toliko više (svega 1,5 – 5 puta viša koncentracija). Zanimljivo je da je koncentracija spojeva iz skupine „ostalo“ u svim uzorcima činila manje od 5 %, a otkrivene su visoke koncentracije acesulfama (0,39 ng/L na Hrušćici) i umjereno visoke koncentracije iopromida (0,19 ng/L na Hrušćici). Umjetna sladila, aspartam i acesulfam, poznata su kao prehrambeni otrovi modernog doba. Smatraju se najistraživanijom namirnicom pa tako postoje i mnoga istraživanja koja ukazuju na pozitivne i negativne učinke pojedinih vrsta umjetnih sladila (Bian i sur., 2017), no podaci o toksičnosti prijavljeni do sada smatraju se nedostatnim. Acesulfam je sintetički spoj, derivat

acetoacetatne kiseline, koji se koristi kao zaslađivač u bezalkoholnim pićima, hrani i određenim potrošačkim proizvodima kao što je pasta za zube (Buerge i sur., 2009). Istraživanje Buerge i sur. (2010) pokazalo je da je acesulfam dobar pokazatelj prisutnosti otpadnih voda jer kvantitativno odražava onečišćenje otpadnim vodama iz domaćinstava, a dovoljno je postojan i hidrofilan da dođe i do podzemnih voda. Spoj je pronađen u mnogim otpadnim (11 – 46 µg/L), površinskim (jezero Greifensee - 2,8 µg/L; rijeka Glatt - 6,9 µg/L) i podzemnim vodama (4,7 µg/L) Švicarske (Buerge i sur., 2010).

Hormoni su u gotovo svim uzorcima činili manje od 1 % ukupne koncentracije zabilježenih OO. Iznimka je postaja Jesenice na kojoj su hormoni bili značajno povišeni (2,31 %) u odnosu na ostale postaje zbog zabilježene visoke koncentracije hormona progesterona (0,30 ng/L). U radu Torres i sur. (2015) na rijeci Piracicaba (Brazil) utvrđena koncentracija progesterona varirala je između 0,58 – 3 ng/L. Hormoni i u vrlo niskim koncentracijama mogu promijeniti metabolizam i fiziološke funkcije kod mnogih organizama. Ovi lijekovi sve se češće koriste širom svijeta, a mnogi su opasne i potentne bioaktivne kemijske tvari (Sirés i Brillas, 2012) koje mogu ugroziti kvalitetu vodnih resursa, biološku raznolikost i ravnotežu u vodenim ekosustavima (Alda i Barceló, 2001). Često su pronađeni u površinskim i podzemnim vodama, tlu te sedimentu u koncentracijama od ng/L do mg/L, a to su količine za koje se zna da uzrokuju promjene u endokrinom sustavu vodenih organizama (Torres i sur., 2015). Neki se hormonski lijekovi, kao što su estrogeni i progestageni, smatraju onečišćivačima od rastućeg značaja za okoliš (ORZO) (Gros i sur., 2009). Prisutnost prirodnih hormona 17β-estradiola, estriola i progesterona u prirodnim vodenim tijelima snažan je pokazatelj onečišćenja otpadnim vodama iz domaćinstava (Aukidy i sur., 2012.). Sintetički steroidni estrogen 17α-etinilestradiol najčešće je otkriveni hormon u površinskim vodama i to zbog korištenja u oralnim kontraceptivima (Han i sur., 2012). Nakon primjene, značajan dio lijeka izlučuje se urinom i izmetom pa nepromijenjeni ili kao aktivni metaboliti ulaze u okoliš gdje se opiru konvencionalnim procesima obrade vode, dugo ostaju postojani i predstavljaju opasnost za okoliš (Farré i sur., 2008).

4.2. Ponašanje, kretanje i hranjenje životinja

Najnovija dostignuća u tehnologijama video praćenja pružaju mogućnost kvantificiranja obrazaca ponašanja, osobito kretanja vodenih beskralježnjaka, koji do sada nisu bili dobro proučeni i shvaćeni (Augusiak i Van den Brink, 2016). Ponašanje životinja, kao jedan od parametara mjerenja stresa u onečišćenom okolišu, osjetljiva je i značajna krajnja točka koja dobiva sve veću pozornost u mnogim ekotoksikološkim istraživanjima. Ponašanje povezuje fiziološku aktivnost s ekološkim procesima i može biti vrlo osjetljivo na podražaje iz okoliša i izloženost kemikalijama (Augusiak i Van den Brink, 2016). Testovi ponašanja od posebnog su interesa za neurotoksikološka istraživanja u vodenom okolišu (Legradi i sur., 2018). Utvrđeno je da su testovi ponašanja najosjetljiviji alat pri otkrivanju učinaka štetnih tvari (Melvin i Wilson, 2013), a istraživanja su pokazala da brojni pesticidi (Augusiak i Van den Brink, 2016; Malev i sur., 2012), farmaceutici (De Lange i sur., 2006) i industrijske kemikalije (Negishi i sur., 2014) u subletalnim koncentracijama imaju učinak na ponašanje pojedinih organizama.

Vodenbuhe su modelni organizmi koji se široko koriste u ekotoksikološkim ispitivanjima, a stopa smrtnosti najčešći je biološki učinak odnosno krajnja točka koja se promatra. Nakon 24 h izlaganja sve su vodenbuhe u ovom istraživanju bile žive. Iako su vodenbuhe vrlo osjetljive na onečišćenje, možemo zaključiti da uzorci vode, prema ovom parametru, nisu toliko onečišćeni da izazovu akutni letalni učinak nakon 24 h izlaganja. Nakon 48 h uočena je manja stopa smrtnost na Jankomiru (5 %, što ulazi u normalnu 10 %-tnu varijaciju). Statistički značajnija veća smrtnost zabilježena je na Rugvici (12,5 %) gdje je uočena pozitivna korelacija između smrtnosti vodenbuha i razine onečišćenja pošto je postaja Rugvica druga najonečišćenija postaja po ukupnoj koncentraciji OO i treća po broju pronađenih vrsta OO. Premda su smrtnost i imobilizacija glavne krajnje točke koje se koriste za određivanje toksičnosti, otkrivanje promjena izazvanih nekim kemikalijama, osobito u nižim, subletalnim koncentracijama, može zahtijevati osjetljivije biomarkere. Kako su brojna istraživanja pokazala da se promjene ponašanja u plivanju mogu promijeniti pesticidima, nanočesticama i drugim kemikalijama, analiza ovog parametra smatra se novim metodološkim pristupom za procjenu toksičnosti i praćenje kvalitete vode (Bownik, 2017).

Što se tiče parametara kretanja vodenbuha, brzina, ubrzanje i stopa pokretljivosti na svim su postajama bile smanjene u odnosu na kontrolu. Na svim je postajama uočen pad prosječne brzine kretanja, u odnosu na kontrolu, koji je bio statistički značajan na svim postajama osim na Hrušćici. Najsporije su bile vodenbuhe izlagane uzorcima voda s postaja Jesenice i Lukavec. Na tim je postajama bila zabilježena visoka koncentracija halucinogena i stimulansa koji bi mogli biti razlog ovakvog ponašanja. Rezultati Bahrndorff i sur. (2016) su pokazali da se aktivnost plivanja može povezati sa subletalnim učincima kemikalija prisutnih u vodi koje uzrokuju smanjenje brzine kretanja, a Legradi i sur. (2018) su stimulanse definirali kao vrlo neuroaktivne spojeve. Na Jesenicama i Lukavcu su također zabilježene i povećane koncentracije pesticida organofosfata i karbamata koje su mogle doprinijeti smanjenju kretanja vodenbuha (Brock i Van Wijngaarden, 2012), a složene smjese s industrijskim kemikalijama poput nonilfenolnih spojeva (koji su u vrlo visokim koncentracijama zapaženi na Jesenicama) povećavaju toksičnost i mogu dovesti do veće dezorijentiranosti vodenbuha koje često mijenjaju smjer kretanja (Zein i sur., 2015). Slični su rezultati dobiveni i za prosječno ubrzanje te stopu pokretljivosti, a parametar ukupne prijeđene udaljenosti nije pokazao statistički značajne promjene u odnosu na kontrolni uzorak.

Zanimljivo je istaknuti i vodenbuhe koje su prošle presvlačenje (ostavljajući cijeli stari svlak) nakon tretmana s ispitivanim uzorcima u kojima su očito bile prisutne kemikalije sa stimulirajućim učinkom na proces presvlačenja. Štoviše, nedavno presvučene jedinke mogu biti osjetljivije na djelovanje toksikanata. Kratkoročno izlaganje potiče presvlačenje, za rakove vrlo važan fiziološki proces, koje kontrolira neuroendokrini sustav na koji mogu djelovati različiti toksikanti poput pesticida (Waddy i sur., 2002).

Prosječna brzina kretanja rakušaca, nakon 24 h izlaganja, bila je značajno smanjena na postaji Hrušćica, u odnosu na kontrolne vrijednosti, a smanjenje je uočeno i na Rugvici i Lukavcu, što je i u skladu s povećanim onečišćenjem na tim postajama. Na Jesenicama i Jankomiru, postajama s nešto manjim ukupnim koncentracijama OO, zabilježeno je povećanje aktivnosti. Nakon 48 h, opet je primijećen pad brzine kretanja na Hrušćici i Rugvici. Prosječno ubrzanje rakušaca, nakon 24 h, bilo je ponovno povećano na Jesenicama i Jankomiru, a nakon 48 h, značajno povećanje ubrzanja primijećeno je na Jankomiru i Lukavcu. Neki od prisutnih spojeva u uzorkovanoj vodi, primjerice povećane koncentracije pesticida – herbicida fenmedifama te insekticida moksidektina, mogu inducirati hiperaktivnost i brzo plivanje, a hiperaktivnost u plivanju može se interpretirati i kao odgovor na izbjegavanje prisutnih toksikanata (Roast i sur., 2000). Povećanje ubrzanja na Lukavcu može biti i rezultat

adaptacije na niži stupanj onečišćenja (Shahid i sur., 2018) pošto je Lukavec druga po redu najmanje onečišćena postaja. Na postajama Hrušćica i Rugvica smanjenje ubrzanja bilo je zabilježeno i nakon 24 h i nakon 48 h što potvrđuje da su rakušci izloženi vodi s ovih dviju postaja bili u najvećem stresu pošto su svi parametri, osim stope pokretljivosti, bili smanjeni u odnosu na kontrolu. Stopa pokretljivosti nakon 24 h bila je povišena na svim postajama, a nakon 48 h uočeno je značajnije smanjenje pokretljivosti na postaji Jesenice koje je vjerojatno posljedica iznimno visoke zabilježene količine industrijskih kemikalija. Što se tiče parametra ukupne prijeđene udaljenosti, nakon 24 h izlaganja, uočeno je značajno smanjenje na postaji Hrušćica. Smanjenje je zabilježeno i na Rugvici i Lukavcu. Nakon 48 h, u odnosu na 24 h, uočeno je smanjenje na svim postajama osim na Hrušćici i Rugvici. U pravilu su rakušci na svim postajama bili sporiji nakon 48 h izlaganja, a jedino su na postaji Jankomir svi parametri kretanja bili povišeni u odnosu na kontrolu što se može objasniti time da je postaja Jankomir bila najmanje onečišćena i prema koncentraciji i prema ukupnom broju pronađenih vrsta OO.

Laboratorijski testovi hranjenja, koji slijede metodu stope hranjenja u određenom vremenu (Taylor i sur., 1993), provode se već nekoliko desetljeća. Intraspecifična varijabilnost vrlo je važna u ekotoksikologiji, osobito pri proučavanju subletalnih učinaka, jer razlike u krajnjim točkama i odgovorima na stres među pojedincima mogu biti jako velike (Agatz i Brown, 2014) pa je zbog toga potrebno koristiti veći broj jedinki. Hranjenje kao krajnja točka u ekotoksikološkim istraživanjima korisno je i osjetljivo sredstvo za otkrivanje subletalnih utjecaja na pojedine organizme koji su važni za više organizacijske razine (populacije i ekosustave) (Agatz i Brown, 2014). Aktivnost hranjenja ima izravan utjecaj na razini ekosustava zbog važnosti kruženja hranjivih tvari pa tako *ex situ* testovi hranjenja rakušaca predstavljaju primjerice raspadanje listinca u prirodi, za što su rakušci vrlo važni (Bloor i Banks, 2006). Sposobnost hranjenja pokazatelj je općeg stanja organizma, a smanjeno hranjenje smanjuje i mogućnost preživljavanja (Nyman i sur., 2013). Na hranjenje rakušaca utječu i vrlo niske razine onečišćenja (Bundschuh i sur., 2011), a utjecaji su gotovo trenutni. S druge strane, rakušci pokazuju povećanu razinu adaptacije na niske koncentracije onečišćivala (Shahid i sur., 2018).

U provedenom testu učinkovitosti hranjenja nakon izlaganja, rakušci izlagani uzorkovanoj vodi u pravilu su se manje hranili u odnosu na kontrolu, iako to smanjenje nije bilo statistički značajno. Izuzetak su rakušci izlagani vodi s Lukavca gdje je uočena povećana stopa hranjenja u odnosu na kontrolu. Vjerojatno je razlog tome zabilježeno manje onečišćenje u odnosu na ostale postaje. Najniže stope hranjenja primijećene su na

najonečišćenijim postajama, Hrušćici i Rugvici. Istraživanje Nyman i sur. (2013) pokazalo je da insekticidi imaju potencijal neizravno uzrokovati smrtnost vodenih beskralježnjaka pri niskim subletalnim koncentracijama tako što smanjuju kretanje, a time i hranjenje. Isto je ustanovljeno i za stimulans nikotin koji djeluje na centralni živčani sustav (Buerge i sur., 2008). Industrijske kemikalije također uvelike utječu na metabolizam (LeBlanc i sur., 2000).

U provedenom testu učinkovitosti hranjenja vodenbuha nakon izlaganja primijećen je općeniti pad aktivnosti. Nakon 4 h hranjenja, vodenbuhe izlagane uzorkovanoj vodi manje su se hranile u odnosu na kontrolu, a značajne razlike uočene su na postajama Jesenice, Jankomir i Lukavec gdje su zabilježene najmanje stope hranjenja. Nakon 20 h hranjenja, na Hrušćici i Rugvici uočena je viša stopa hranjenja u odnosu na kontrolu, no nisu uočene statistički značajne promjene što ukazuje ili na pad aktivnosti u kontroli ili na možebitnu adaptaciju na ovu razinu onečišćivala. Najmanja stopa hranjenja, u odnosu na kontrolu, zabilježena je na postaji Jesenice. Spojevi koji su uočeni na toj postaji u višim koncentracijama i koji su potencijalno djelovali na vodenbuhe su antibiotici kloksacilin i nafcilin, analgetici ibuprofen i etodolak, industrijska kemikalija 4-para-nonilfenol (3,52 ng/L), insekticidi spiromesifen i halofenozid te hormon progesteron. Gorokhova i sur. (2015) su izvijestili da antibiotici mogu utjecati na neciljane vrste i rezultirati smanjenjem stope hranjenja i stope rasta, a u svojem su istraživanju uočili smanjenu stopu hranjenje vodenbuha nakon izlaganja antibioticima, što je sukladno i rezultatima dobivenim u ovom radu. Pan i sur. (2017) su također ustanovili kako antibiotici smanjuju učinkovitost hranjenja i u vrlo malim koncentracijama, kao i niske koncentracije ibuprofena (De Castro i sur., 2014). Torres i sur. (2015) su ustanovili da hormoni i pri niskim koncentracijama mijenjaju metaboličke i fiziološke funkcije. Industrijske kemikalije, poput nonilfenola, utječu na metabolizam (LeBlanc i sur., 2000), kao i insekticidi za koje je također ustanovljeno kako smanjuju stopu hranjenja (Villaruel i sur., 1999).

Onečišćivala općenito smanjuju metaboličke stope i inhibiraju unos hrane (LeBlanc i sur., 2000), a posebno je važno istaknuti međudjelovanja između kemikalija. Rezultati kretanja i hranjenja pozitivno koreliraju kod rakušaca odnosno smanjenje prosječne sposobnosti plivanja rezultira i smanjenom stopom hranjenja na što utječe koncentracija OO prisutnih u vodi. Najsporiji rakušci bili su oni izlagani vodi s najonečišćenijih postaja, Hrušćice i Rugvice, a na tim je postajama uočeno smanjenje parametara kretanja te su zabilježene najmanje stope hranjenja. Kod vodenbuha je bilo uočeno suprotno djelovanje pa su tako najniže vrijednosti parametara kretanja i stopa hranjenja uočene na postajama

Jesenice, Jankomir i Lukavec. Može se zaključiti da su vodenbuhe bile osjetljivije (barem u prvih 4 h hranjenja) na neke spojeve pronađene na postajama koje su bile manje onečišćene prema ukupnim koncentracijama OO, a to bi mogle biti skupine opioda i analgetika koje su na potonjim postajama bile zabilježene u povišenim koncentracijama. Na Jesenicama su ustanovljene visoke koncentracije etodolaka (spoj zabilježen jedino na ovoj postaji), naproksena te ibuprofena. Analgetici utječu na vodenbuhe tako što smanjuju stopu razmnožavanja i rasta populacije, ali toksični utjecaj je uočen pri koncentracijama na razini mg/L (Heckmann i sur., 2005), koje su značajno više od ustanovljenih u ovom radu (na razini ng/L).

Primijećeno je da malo povećana koncentracija OO (do 11 ng/L) izaziva pojačanu aktivnost, dok ukupna koncentracija OO iznad 13 ng/L uglavnom izaziva supresiju. S obzirom na visoke koncentracije farmaceutika (Slika 20) možemo pretpostaviti da su upravo oni odigrali glavnu ulogu u supresiji aktivnosti modelnih organizama. Važno je naglasiti da ovi podaci trebaju daljnju obradu koja bi omogućila detaljnije analize obrazaca ponašanja, uključujući i činjenicu visoke individualne varijabilnosti koja stvara mnoge poteškoće u interpretaciji podataka (Malev, 2012).

4.3. Biokemijski biomarkeri

Učinak onečišćenja može se procijeniti na svim razinama biološke organizacije, od ekosustava do molekularne razine. Na biokemijskoj razini, enzimi su ti koji su uključeni u detoksikaciju organskih onečišćivala i koji su vrlo korisni kao pokazatelji izloženosti onečišćivalima pošto su jedna od prvih linija obrane i odgovora na onečišćenje. Uzorkovana voda izazvala je oksidacijski stres u rakušcima, a posljedica izloženosti mnogim onečišćivalima prisutnim u vodi na staničnoj razini je stvaranje ROS. Povećana aktivnost antioksidacijskih i detoksikacijskih enzima stoga može ukazivati na oksidacijski stres i prisutnost onečišćivala u vodi (Valavanidis i sur., 2006; Livingstone, 2001). Funkcija antioksidacijskih i detoksikacijskih enzima u svim živim organizmima je uklanjanje ROS i stranih molekula iz organizma. Prisutnost teških metala može inhibirati neke enzime i smanjiti njihovu aktivnost. U uzorcima vode rijeke Save nije bila mjerena koncentracija teških metala, no oni su također mogli pridonijeti primijećenom toksičnom učinku (Gulin i sur., 2018; Kutlu i Susuz, 2000).

Kod rakušaca izloženih najonečišćenijim postajama prema ukupnoj koncentraciji OO, Hrušćici i Rugvici, primijećeno je značajno povećanje ukupnih proteina, dok je na svim drugim postajama uočeno smanjenje u odnosu na kontrolu. Na Lukavcu je, nadalje, zabilježeno statistički značajno smanjenje. Količina ukupnih proteina u korelaciji je s onečišćenjem jer su povišeni proteini uočeni upravo na najonečišćenijim postajama (Hrušćici i Rugvici). Povećane koncentracije ukupnih topljivih proteina potvrdile su stresne uvjete na onečišćenim postajama (Gulin i sur., 2018). Na koncentraciju i sastav proteina mogu utjecati vanjski čimbenici, kao što su fluktuacije u okolišnim uvjetima (temperatura i dostupnost hrane) ili unutarnji čimbenici poput metaboličke i fiziološke aktivnosti (Brazao i sur., 2003).

Mjerenje aktivnosti GST omogućuje brze rezultate jer je to vrlo osjetljiv biomarker izloženosti onečišćivalima (Warwick, 1997). Aktivnost GST bila je povišena u rakušcima izloženim gotovo svim uzorcima vode. Značajno povišena aktivnost bila je u onim rakušcima koji su bili izloženi vodi s Jankomira, a jedino je na postaji Lukavec uočena smanjena aktivnost GST. Inhibicija GST je moguća zbog neravnoteže u omjeru reduciranog i oksidiranog glutaciona zbog učinka onečišćivala prisutnih u vodi rijeke Save (Mathew i sur., 2006). Smanjenje i inhibicija GST aktivnosti u vodenim makrobekralježnjacima utvrđena je i u radu Kutlu i Susuz (2000), a to može biti rezultat manjeg stupnja onečišćenja gdje je bio manji stres pa aktivnost GST nije bila povećana. Iako je Jankomir najmanje onečišćena postaja, povećanje aktivnosti GST može biti uzrokovano onečišćivalima koja nisu izmjerena ili zbog sinergističkih učinaka među toksikantima ili pak zbog povećane prisutnosti specifičnih onečišćivala (Babić i sur., 2017). Povećana aktivnost GST uočena je i u istraživanjima Horion i sur. (2015) te Cikcikoglu Yildirim i Yaman (2019) koji su ustvrdili i da trajanje izloženosti značajno utječe na aktivnost GST. Veliki broj lijekova, halogeniranih ugljikovodika, epoksida i insekticida reagira sa sulfhidrilnom (SH) skupinom glutaciona. Reakcija se može katalizirati s jednim ili više enzima iz skupine transferaza te se stoga smatra da je glavna funkcija ovih enzima pomoć u detoksikaciji raznih toksičnih spojeva (Kutlu i Susuz, 2000), a promjene u aktivnosti GST mogu ukazivati na učinke na višim razinama biološke organizacije.

Povećan sadržaj malondialdehida pouzdan je biomarker i pokazatelj lipidne peroksidacije te oštećenja stanične membrane jer je MDA jedan od završnih proizvoda oksidacije lipida (Radić i sur., 2010). S obzirom da sadržaj MDA nije bio povećan u rakušcima izloženim uzorcima vode, može se zaključiti da ili prisutna onečišćivala u izmjerenim koncentracijama ne uzrokuju lipidnu peroksidaciju i oštećenja lipidne

komponente stanične membrane ili je razlog tome povećana aktivnost GST i detoksikacijskih procesa. Na Jesenicama je uočeno značajno smanjenje sadržaja MDA, dok je na Jankomiru zabilježen blagi porast u odnosu na kontrolu. Povećanje sadržaja MDA moglo bi se objasniti i prisutnošću nekih onečišćivala koja nisu bila obuhvaćena kemijskom analizom npr. teški metali. Smanjenje količine MDA primijećeno je u istraživanju Yildirim i sur. (2018) dok je povećan sadržaj MDA zabilježen u istraživanju Cikcikoglu Yildirim i Yaman (2019) te Khan i sur. (2011).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na to da u rijeci Savi postoji širok spektar organskih onečišćivala koja vrlo vjerojatno izazivaju oksidacijski stres kod vodenih organizama i koja bi potencijalno mogla imati dugoročno negativne utjecaje na slatkovodni ekosustav. To je dokazano upotrebom ekotoksikoloških biotestova na modelnim organizmima iz skupine rakova, mjerenjem različitih biokemijskih biomarkera te analizama kretanja i učinkovitosti hranjenja. Iako je napravljena opsežna kemijska karakterizacija, nije sve uzeto u obzir jer je ovo istraživanje uključivalo samo organska onečišćivala i nisu utvrđene druge potencijalno važne skupine onečišćivala kao što su primjerice teški metali. Unatoč tome, kemijska analiza vode rijeke Save omogućila je dobar uvid u opći status onečišćenja rijeke. Dodatno korištenje biotestova s modelnim organizmima, uz kemijsku karakterizaciju vode, omogućilo je analizu subletalnog djelovanja organskih onečišćivala i uvid u moguće razloge uočenih promjena na slatkovodnim skupinama rakova.

5. ZAKLJUČAK

Kemijska karakterizacija rijeke Save pokazala je da na odabranim postajama u blizini Zagreba i Siska postoji veliki raspon organskih onečišćivala prisutnih u vodi. Ipak, u obzir nisu uzeti svi mogući toksikanti i usprkos tome što su detektirana 483 spoja (od 571 analiziranog), moguće je da su neki drugi spojevi, koji nisu mjereni, imali utjecaj na modelne organizme. Koncentracije onečišćivala dobivene u ovom radu značajno su manje od zabilježenih u većini drugih istraživanja, a na varijabilnost podataka mogu utjecati primjerice različiti obrasci potrošnje lijekova ili hidrodinamičke karakteristike vodnih tijela poput brzine protoka koja doprinosi raspršivanju i razrjeđivanju onečišćivala.

Kako bi se dobio detaljniji uvid u potencijalne toksične učinke koje detektirane kemikalije mogu uzrokovati, korišteni su testovi akutne toksičnosti s modelnim organizmima iz skupine rakova. Rezultati pokazuju da su u vodi rijeke Save prisutna organska onečišćivala koja uzrokuju povećani stres u modelnim organizmima. Isto tako primijećeno je da izabrani modelni organizmi imaju različitu osjetljivost na iste uzorke vode. Analize kretanja i hranjenja pokazale su se kao vrlo osjetljivi i korisni parametri u procjeni toksičnog subletalnog djelovanja složenih smjesa onečišćivala. Rezultati kretanja i hranjenja pozitivno koreliraju i kod vodenbuha i kod rakušaca odnosno smanjenje prosječne sposobnosti plivanja dovodi i do smanjenja stope hranjenja. U modelnim organizmima utvrđena je i promjena sadržaja proteina, malondialdehida te aktivnosti enzima glutation-S-transferaze. Uzimajući u obzir raznolikost spojeva otkrivenih u ispitivanim uzorcima vode u različitim koncentracijama, teško je odrediti točan uzrok koji stoji iza uočenih učinaka jer postoje mnogi čimbenici koje također treba uzeti u obzir kao što su metaboliti, međudjelovanja između kemikalija, bioraspoloživost, onečišćivala koja nisu zabilježena analizom vode i drugo. No, uočena je korelacija između rezultata kemijske karakterizacije opterećenijih postaja i rezultata biokemijskih parametara, kretanja i hranjenja.

Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju može se zaključiti da su izabrani modelni organizmi *Gammarus fossarum* i *Daphnia magna* dovoljno osjetljivi i pogodni biološki modelni organizmi za biomonitoring i ispitivanje toksičnosti u vodenom okolišu. Kao najosjetljiviji parametri kod vodenbuha pokazali su se učinkovitost hranjenja te parametri kretanja prosječna brzina i prosječno ubrzanje nakon 24 h, a kod rakušaca su to ukupni proteini, prosječna brzina i ukupna prijeđena udaljenost nakon 24 h te prosječno ubrzanje nakon 48 h.

6. LITERATURA

Agatz, A., Brown, C.D. (2014): Variability in feeding of *Gammarus pulex*: moving towards a more standardised feeding assay. *Environmental Science Europe* 26: 15

Ahrens, L., Bundschuh, M. (2014): Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1921-1929

Alaya, A., Muñoz, M.F., Argüelos, S. (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-31

Alda, M.J., Barceló, D. (2001): Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A* 938(1-2): 145-153

Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B. (2006): Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews* 25: 838-865

Al-Odaini, N.A., Zakaria, M.P., Yaziz, M.I., Surif, S. (2010): Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 6791-6806

Amiridou, D., Voutsas, D. (2011): Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials* 185: 281-286

Anilkumar, P., Meenaksh, G. (2012): Ascorbate effect on protein content during nickel intoxication in the freshwater bivalve, *Lamellidenscorrianus*. *Bioscience Discovery* 3(2): 270-274

Antonijević, M.D., Arsović, M., Časlavský, J., Cvetković, V., Dabić, P., Franko, M., Ilić, G., Ivanović, M., Ivanović, N., Kosovac, M. i sur. (2014): Actual contamination of the Danube and Sava rivers at Belgrade (2013). *Journal of the Serbian Chemical Society* 79: 1169-1184

Augusiak, J., Van den Brink, P.J. (2016): The influence of insecticide exposure and environmental stimuli on the movement behaviour and dispersal of a freshwater isopod. *Ecotoxicology* 25 (7): 1338-1352

Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrović, M., Barceló, D. (2012): Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment* 438: 15-25

Babić, S., Barišić, J., Stipaničev, D., Repec, S., Lovrić, M., Malev, O., Martinović-Weigel, D., Čož-Rakovac, R., Klobučar, G. (2018): Assessment of river sediment toxicity: combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with in silico toxicity characterization. *Science of the Total Environment* 643: 435-450

Babić, S., Barišić, J., Višić, H., Sauerborn Klobučar, R., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R., Klobučar, G. (2017): Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in zebrafish embryo using multiple endpoint testing. *Water Research* 115: 9-21

Bahrndorff, S., Michaelsen, T.Y., Jensen, A., Marcussen, L.F., Nielsen M.E., Roslev, P. (2016): Automated swimming activity monitor for examining temporal patterns of toxicant effects on individual *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology* 36: 896-902

Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S. (2001): Pesticide-induced oxidative stress: perspective and trend. *Reviews on Environmental Health* 16 (1): 1-40

Barreiros, L., Queiroz, J.F., Magalhães, L.M., Silva, A.M.T., Segundo, M.A. (2016): Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices – A review. *Microchemical Journal* 126: 243-262

Bayona, J.M., Albaiges, J. (2006): Sources and fate of organic contaminants in the marine environment. U: Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA. J. K. Volkman, (ur.). *Springer Berlin, Heidelberg*: 325-370

Bhandari, R.K., vom Saal, F.S., Tillitt, D.E. (2015): Transgenerational effects from early developmental exposures to bisphenol A or 17 α -ethinylestradiol in medaka, *Oryzias latipes*. *Scientific Reports*5: 9303

Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., Lu, K. (2017): The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PloS One* 12: e0178426

Bielen, A., Šimatović, A., Kosić-Vukšić, J., Senta, I., Ahel, M., Babić, S., Jurina, T., González-Plaza, J.J., Milaković, M., Udiković-Kolić, N. (2017): Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *WaterResearch* 126: 79-87

Bloor, M.C., Banks, C.J. (2006): An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: the altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *Environmental International* 32: 22-27

Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V., Vinggaard, A.M. (2007): Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol *in vitro*: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives* 115:69-76

Bossi, R., Strand, J., Sortkjær, O., Larsen, M.M. (2008): Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environment International* 34: 443-450

Bound, J.P., Voulvoulis, N. (2004): Pharmaceuticals in the aquatic environment: a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* 56: 1143-1155

Bownik, A. (2017): *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment* 601-602: 194-205

- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brazao, S., Morais, S., Boaventura, D.** (2003): Spatial and temporal variation of the fatty acid composition of *Patella* spp. (Gastropoda: Prosobranchia) softbodies and gonads. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136 B: 425-441
- Brkić, Ž.** (2017): The relationship of the geological framework to the Quaternary aquifer system in the Sava River valley (Croatia). *Journal of the Croatian Geological Survey and the Croatian Geological Society* 70/3: 201-213
- Brock, T.C.M., Van Wijngaarden, R.P.A.** (2012): Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environmental Science and Pollution Research International* 19: 3610-3618
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Heynen, M., Jonsson, M.** (2014): Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems – impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of The Royal Publishing Society B369*: 20130580
- Buerge, I.J., Buser, H.-R., Kahle, M., Müller, M.D., Poiger, T.** (2010): The artificial sweetener acesulfame as marker of domestic wastewater in groundwater. GQ10: Groundwater Quality Management in a Rapidly Changing World (Proc. 7th International Groundwater Quality Conference, Zurich, Švicarska, IAHS Publ 342, 2011.)
- Buerge, I.J., Buser, H.-R., Kahle, M., Müller, M.D., Poiger, T.** (2009): Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: an ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. *Environmental Science and Technology* 43: 4381-4385
- Buerge, I.J., Kahle, M., Buser, H.-R., Müller, M.D., Poiger, T.** (2008): Nicotine derivatives in wastewater and surface waters: application as chemical markers for domestic wastewater. *Environmental Science and Technology* 42: 6354-6360
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Schulz, R.** (2011): The functional and physiological status of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater. *Environmental Pollution* 159: 244-249
- Carvalho, F. P.** (2006): Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy* 9: 685-692
- Chapman, P.M.** (2007): Determining when contamination is pollution – weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* 33 (4): 492-501
- Chaube, R., Gautam, G.J., Joy, K.P.** (2013): Teratogenic effects of 4-nonylphenol on early embryonic and larval development of the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 64: 554-561

- Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L. (2015):** Gammarids as reference species for freshwater monitoring. *Aquatic Ecotoxicology*, Advancing tools for dealing with emerging risks, poglavlje 11: 253-280
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., Fent, K. (2010):** Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquatic Toxicology* 96: 167-181
- Cikcikoglu Yildirim, N., Yaman, M. (2019):** The usability of oxidative stress and detoxification biomarkers in *Gammarus pulex* for ecological risk assessment of textile dye methyl orange. *Chemistry and Ecology* 35: 319-329
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (1998):** Standard methods for the examination of water and wastewater. U: 20th edition APHA, AWWA, WEF, Chapter Toxicity 8000 and Chapter 4500-O
- Conrad, J.L., Weinersmith, K.L., Brodin, T., Saltz, J.B., Sih, A. (2011):** Behavioural syndromes in fishes: A review with implications for ecology and fisheries management. *Journal of Fish Biology* 78: 395-435
- Corrales, J., Kristofco, L.A., Steele, W.B., Yates, B.S., Breed, C.S., Spencer Williams, E., Brooks, B.W. (2015):** Global assessment of bisphenol A in the environment. *Dose Response* 13: 1559325815598308
- Cote, J., Clobert, J., Brodin, T., Fogarty, S., Sih, A. (2010):** Personality-dependent dispersal: characterization, ontogeny and consequences for spatially structured populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365: 4065-4076
- Davies, K.J.A. (1995):** Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61: 1-31
- de Castro, F.J., dos Santos, D.R.A., Picolomini Buongiorno, C.R., Sanzi Cortez, F., Seabra Pereira, C.D., Choeri, R.B., Cesar, A. (2014):** Ecotoxicological assessment of four pharmaceutical compounds through acute toxicity tests. *O Mundo da Saude* 38: 51-55
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lüring, M., Peeters, E.T. (2006):** Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78: 209-216
- Dell'Omo, G. (2002):** Behavioural ecotoxicology. Wiley, New York.
- 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 and Cardiovascular Diseases* 15: 316-328
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L., Sullivan, C.A. (2006):** Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163-182

Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193-198

EPA (1996): Gammarid acute toxicity test, OPPTS 850.1020 guideline, EPA 712-C-96-130

Erickson, B.E. (2017): How many chemicals are in use today? *C&EN* 95 (9): 23-24

Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D. (2008): Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* 27: 991-1007

Fernandez-Alba, A.R., Guil, M.D.H., Lopez, G.D., Chisti, Y. (2002): Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Analytica Chimica Acta* 451 (2): 195-202

Fochtman, P., Raszka, A., Nierzedzka, E. (2000): The use of conventional bioassays, microbiotests and some “rapid” methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environmental Toxicology* 15:376-384

Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D. (2007): Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1138:32-41

Gautam, G.J., Chaube, R., Joy, K. (2015): Toxicity and tissue accumulation of 4-nonylphenol in the catfish *Heteropneustes fossilis* with a note on prevalence of 4-NP in water samples. *Endocrine Disruptors* 3: e981442

Glazier, D.S. (2009): Amphipoda. U: Likens, G. E. (ur.) *Encyclopedia of Inland Waters, Oxford. Elsevier, Vol. 2:* 89-115

Gómez-Canela, C., Miller, T.H., Bury, N.R., Tauler, R., Barron, L.P. (2016): Targeted metabolomics of *Gammarus pulex* following controlled exposures to selected pharmaceuticals in water. *Science of the Total Environment* 562: 777-788

Gorga, M., Insa, S., Petrović, M., Barceló, D. (2015): Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Science of the Total Environment* 503-504: 69-86

Gorokhova, E., Rivetti, C., Furuhausen, S., Edlund, A., Ek, K., Breitholtz, M. (2015): Bacteria-mediated effects of antibiotics on *Daphnia* nutrition. *Environmental Science and Technology* 49: 5779-5787

Granmo, A., Ekelund, R., Berggren, M., Magnusson, K. (1991): Toxicity of 4-nonylphenol to aquatic organisms and potential for bioaccumulation. *Seminar on nonylphenolethoxylates (NPE) and nonylphenol (NP):* 3907, 53-75. Grand Hotel, Saltsjöbaden, Švedska

Gros, M., Petrović, M., Barceló, D. (2009): Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry* 81 (3): 898-912

Gross-Sorokin, M.Y., Grist, E.P.M., Cooke, M., Crane, M. (2003): Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate *Gammaruspulex*: how important is feeding rate? *Environmental Science and Technology* 37: 2236-2241

Gulin, V., Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Sertić Perić, M., Matoničkin Kepčija, R. i sur. (2018): Assessment of metal exposure in industrially/agriculturally impacted freshwater ecosystem using amphipod *Gammarusfossarum* Koch as a bioindicator. Book of abstracts. 3rd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (CESAMIR) 2018., str. 40

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011): Protista – Protozoa i Metazoa – Invertebrata. Strukture i funkcije. Alfa, Zagreb, 1-584

Habig, W.H., Jacoby, W.B. (1981): Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods of enzymology* 77: 398-405

Hafner, C., Gartiser, S., Garcia-Käuffer, M., Schiwy, S., Hercher, C., Meyer, W., Achten, C., Larsson, M., Engwall, M., Keiter, S., Hollert, H. (2015): Investigations on sediment toxicity of German rivers applying a standardized bioassay battery. *Environmental Science and Pollution Research* 22:16358-16370

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E. (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: A review. *Chemosphere* 36: 357-393

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007): Free radicals in biology and medicine. 4th Edition, Oxford University Press, New York, 704. str.

HALMED (2018):

<http://halmed.hr/en/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjescaopotrosnji-lijekova>,
<http://halmed.hr/fdsak3jnFsk1Kfa/publikacije/Potrosnja-lijekova-u-Hrvatskoj-2013-2017.pdf>

Han, J., Qiu, W., Meng, S., Gao, W. (2012): Removal of ethinylestradiol (EE2) from water via adsorption on aliphatic polyamides. *Water Research* 46: 5715-5724

Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayers, P.A. (1978): A review of physiological chemistry. Long Medical Publications, California

Harris, K.D.M., Bartlett, N.J., Lloyd, V.K. (2011): Daphnia as an emerging epigenetic model organism. Hindawi Publishing Corporation. *Genetics Research International* 2012, 8 str.

Heckmann, L.H., Connon, R., Hooper, H., Maund, S., Hutchinson, T.H., Sibly, R., Callaghan, A. (2005): Molecular and population stress responses of *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. U: Fifteenth Annual Meeting of SETAC-Europe, Lille, Francuska

Hellou, J. (2011): Behavioural ecotoxicology: an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 1-11

Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelo, D. (2006): Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69: 334-342

Hill, R.L.Jr, Janz, D.M. (2003): Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology* 63: 417-442

Hollert, H., Keiter, S.H. (2015): *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 16243-16246

Horion, S., Thomé, J.P., Gismondi, É. (2015): Changes in antitoxic defense systems of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to BDE-47 and BDE-99. *Ecotoxicology* 24: 959-966

Hunter, J.D. (2007): Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science and Engineering* 9:90-95

Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., McMillan, D., Rao, R. (2008): Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27: 481-489

ISRBC – Međunarodna komisija za sliv rijeke Save (2010): Analiza sliva rijeke Save. http://www.savacommission.org/dms/docs/dokumenti/documents_publications/publications/sava_river_basin_analysis_-_summary/sava_booklet_hrv.pdf

Janero, D. R. (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid: reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 515-540

Jansen, M., Coors, A., Stoks, R., De Meester, L. (2011): Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: a case study in *Daphnia*. *Ecotoxicology* 20 (3): 543-551

Jensen, A.A., Leffers, H. (2008): Emerging endocrine disrupters: perfluoroalkylated substances. *International Journal of Andrology* 31: 161-169

Jha, A.N. (2004): Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research* 553: 1-17

Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS) (2016): Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. 1st edition 3rd revision. *FAO plant production and protection paper 228*, WHO/FAO, Rim 2016 - <http://www.fao.org/3/a-i5713e.pdf>

Källquist, T., Milačić, R., Smital, T., Thomas, K.V., Vranes, S., Tolefsen K. (2008): Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water research* 42: 2146-2156

Khan, F.R., Irving, J.R., Bury, N.R., Hogstrand, C. (2011): Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102 (1-2): 95-103

Kleinjans, J.C.S., van Schooten, F.J. (2002): Ecogenotoxicology – the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 173-179

Kortner, T.M., Arukwe, A. (2007): The xenoestrogen, 4-nonylphenol, impaired steroidogenesis in previtellogenic oocyte culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by targeting the StAR protein and P450_{sc} expressions. *General and Comparative Endocrinology* 150: 419-429

Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A. (2010): *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 205: 1-76

Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D. (2006): Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. *Mass Spectrometry Reviews* 25: 900-916

Kutlu, M., Susuz, F. (2000): Biochemical characterization of glutathion-S-transferase and effects of lead acetate in *Gammarus pulex*. *Acta Pharmaceutica Turcica* 42: 113-117

Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D., Scholz, N.L. (2009): The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environmental Health Perspectives* 117: 348-353

LeBlanc, G.A., Mu, X., Rider, C.V. (2000): Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives* 108: 1133-1138

Legradi, J.B., Di Paolo, C., Kraak, M.H.S., van der Geest, H.G., Schymanski, E.L., Williams, A.J., Dingemans, M.M.L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M.-L. i sur. (2018): An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environmental Sciences Europe* 30: 46

Li, W. C. (2014): Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* 187: 193-201

Linden, A., Gülden, M., Martin, H-J., Maser, E., Seibert, H. (2008): Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicology in Vitro* 22: 1371-1376

Lindholm, C., Wynne, P., Marriott, P., Pedersen, S., Bjerregaard, P. (2003): Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 135: 169-177

Litwa, E., Rzemieniec, J., Wnuk, A., Lason, W., Krzeptowski, W., Kajta, M. (2014): Apoptotic and neurotoxic actions of 4-para-nonylphenol are accompanied by activation of retinoid X receptor and impairment of classical estrogen receptor signaling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 144: 334-347

Livingstone, D.R. (2001): Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42: 656-666

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Pipe, R.K. (2000): Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of Environment and Pollution* 13: 56-91

Lončar, V. (2015): Nastajanje i izlučivanje slobodnih radikala kod životinja pri stresnim uvjetima. Završni rad. Poljoprivredni fakultet, Osijek

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

Lykkesfeldt, J. (2007): Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta* 380: 50-58

MacNeil, C., Elwood, R.W., Dick, J.T.A. (2000): Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv für Hydrobiologie* 149: 87-107

Mäenpää, K., Kukkonen, J.V. (2006): Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbricus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Aquatic Toxicology* 77: 329-338

Magi, E., Scapolla, C., Di Carro, M., Liscio, C. (2010): Determination of endocrinedisrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 45: 1003-1011

Malev, O. (2012): Toxic effects of selected neonicotinoids through different organisational levels: *in vitro* and *in vivo* studies. Doktorska disertacija, Sveučilište u Novoj Gorici, Slovenija

Malev, O., Sauerborn Klobučar, R., Fabbretti, E., Trebše, P. (2012): Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104: 178-186

Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N. (2002): Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 361-368

Mankiewicz-Boczek, J., Nałęcz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M., Sawicki, J. (2008): Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 830-836

Mathew, N., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K. (2006): Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert opinions on therapeutic patterns* 16: 431-444

McKinney, W. (2010): Datastructures for statistical computing in Python, Proceeding softwer. *The 9th Pythonin Science Conference*: 51-56

Melvin, S.D., Wilson, S.P. (2013): The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis. *Chemosphere* 93: 2217-2223

Milačić, R., Zuliani, T., Vidmar, J., Oprčkal, P., Ščančar, J. (2017): Potentially toxic elements in water and sediments of the Sava River under extreme flow events. *Science of The Total Environment* 605-606: 894-905

Mills, C.L., Shukla, D.H., Compton, G.J. (2006): Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology* 77: 197-201

Negishi, T., Nakagami, A., Kawasaki, K., Nishida, Y., Ihara, T., Kuroda, Y., Tashiro, T., Koyama, T., Yoshikawa, Y. (2014): Altered social interactions in male juvenile cynomolgus monkeys prenatally exposed to bisphenol A. *Neurotoxicology and Teratology* 44: 46-52

Nyman, A.-M., Hintermeister, A., Schirmer, K., Ashauer, R. (2013): The insecticide imidacloprid causes mortality of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* by interfering with feeding behavior. *PloS One* 8: e62472

OECD (2004): OECD 202 Guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761

Oliveira, L.L., Antunes, S.C., Gonçalves, F., Rocha, O., Nunes, B. (2015): Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 123-131

OEHHA (2015): Air toxics hot spots program. Guidance manual for the preparation of health risk assessments. www.oehha.ca.gov

Orešić, D. (2004): Zagreb - grad na Savi? www.geografija.hr/hrvatska/zagrebgrad-na-savi

Oropesa, A.L., Floro, A.M., Palma, P. (2017): Toxic potential of the emerging contaminant nicotine to the aquatic ecosystem. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 16605-16616

Pal, A., Yew-Hoong Gin, K., Yu-Chen Lin, A., Reinhard, M. (2010): Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408: 6062-6069

Pan Y., Yan, S., Li, R., Hu, Y., Chang, X. (2017): Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. *Scientific Reports* 7: 40385

Pestana, J.L.T., Alexander, A.C., Culp, J.M., Baird, D.J., Cessna, A.J., Soares, A.M.V.M. (2009): Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution* 157: 2328-2334

Porter, A.J., Hayden, N.J. (2002): Nonylphenol in the environment: a critical review. U: Vermont University Publication: 1-37

Preston, B.L. (2002): Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Management* 29: 311-323

- Radić, S.**, Stipaničev, D., Cvjetko, P., Lovrenčić Mikelić, I., Marijanović Rajčić, M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M. (2010): Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology* 19: 216-222
- Reinhold, D.**, Vishwanathan, S., Park, J.J., Oh, D., Suanders, M.F. (2010): Assessment of plant – driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chemosphere* 80: 687-692
- Renner, R.** (1997): European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science and Technology* 31: 316A-320A
- Richter, E.**, Hecht, F., Schnellbacher, N., Ternes, T.A., Wick, A., Wode, F., Coors, A. (2015): Assessing the ecological long-term impact of wastewater irrigation on soil and water based on bioassays and chemical analyses. *Water Research* 84: 33-42
- Roast, S.D.**, Widdows, J., Jones, M.B. (2000): Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 47: 227-241
- Rodrigues, A.C.M.**, Henriques, J.F., Domingues, I. i sur. (2016): Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquatic Toxicology* 170: 371-376
- Rodriguez, A.**, Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P.L., Andersson, M. (2017): ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. User guide for version 2.61 (Submitted to the Journal Methods in Ecology and Evolution). Umeå University, Sweden
- Sabra, F.**, Mehana, E. (2015): Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences* 3: 40-60
- Saravi, S.S.S.**, Shokrzadeh, M. (2011): Role of pesticides in human life in the modern age: a review. U: Pesticides in the modern world - risks and benefits. Stoytcheva, M. (ur.). *InTech*: 4-11
- Sarkar, S.** (2006): Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15: 333-340
- Sauvant, M.P.**, Pepin, D., Bohatier, J., Groliere, C.A., Guillot, J. (1997): Toxicity assessment of 16 inorganic environmental pollutants by six bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37: 131-140
- Sauvé, S.**, Desrosiers, M. (2014): A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* 8: 8-15
- Schulze-Sylvester, M.**, Heimann, W., Maletz, S., Seiler, T.-B., Brinkmann, M., Zielke, H., Schulz, R., Hollert, H. (2016): Are sediments a risk? An ecotoxicological assessment of sediments from a quarry pond of the Upper Rhine River. *Journal of Soils and Sediments* 16: 1069-1080

- Scott, G.R., Sloman, K.A.** (2004): The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: interacting behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68: 369-392
- Seabold, S., Perktold, J.** (2010): Statsmodels: Econometric and statistical modeling with Python. PROC 9th PYTHON Sci CONF
- Seeland, A., Oetken, M., Kiss, A., Fries, E., Oehlmann, J.** (2012): Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1781-1790
- Servos, M.R.** (1999): Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenolpolyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada* 34(1):123-177
- Shahid, N., Becker, J.M., Krauss, M., Brack, W., Liess, M.** (2018): Adaptation of *Gammaruspulex* to agricultural insecticide contamination in streams. *Science of the Total Environment* 621: 479-485
- Sharma, B.K.** (2005): Water Pollution. Krisha Prakashan Media, Meerut.
- Silva, A., Figueiredo, S.A., Sales, M.G., Delerue-Matos, C.** (2009): Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* - a useful tool in hazardous effluents management. *Journal of Hazardous Materials* 167: 179-185
- Sirés, I., Brillas, E.** (2012): Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review. *Environment International* 40: 212-229
- Smital, T., Ahel, M.** (2015): Ecotoxicological characterization of the Sava River: biomarker responses and biological assays. The Sava River. The Handbook of the Environmental Chemistry, Vol.31, *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*: 177-200
- Smital, T.** (2008): Acute and chronic effects of emerging contaminants. Emerging contaminants from industrial and municipal waste – occurrence, analysis and effects. The Handbook of the Environmental Chemistry, Vol. 5, *Springer-Verlag Berlin*: 105-142
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N.** (2008): Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34: 1033-1049
- Sofilić, T.** (2014): Ekotoksikologija. Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak
- Sparling, D.W.** (2016): Ecotoxicology Essentials - environmental contaminants and their biological effects on animals and plants. Elsevier, London
- Stipaničev, D., Dragun, Z., Repec, S., Rebok, K., Jordanova, M.** (2017): Broad spectrum screening of 463 organic contaminants in rivers in Macedonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135: 48-59

Stipaničev, D. (2011): Ekotoksikološko istraživanje vode rijeke Ilove. Doktorska disertacija, PMF, Zagreb.

Strausfeld, N.J. (1998): Crustacean-insect relationship: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain, Behavior and Evolution* 52: 186-206

Štambuk, A. (2011): Utjecaj onečišćenja na genetičku razmolikost populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819.) Doktorska disertacija, PMF, Zagreb.

Ščančar, J., Heath, E., Zuliani, T., Horvat, M., Kotnik, J., Perko, S., Milačić, R. (2015): Elements and persistent organic pollutants in the sediments of the Sava River. *The Sava River*: 95–121

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidic, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. Pregledni rad. *Medicina* 43: 84-93

Taylor, E.J., Jones, D.P.W., Maund, S.J., Pascoe, D. (1993): A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L). *Chemosphere* 26: 1375-1381

Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Sauerborn Klobučar, R., Barišić, J., Babić, S., Jadan, M., Kepec, S., Kazazić S.P., Matijatko, V., Beer Ljubić, B., Car, I., Repec, S., Stipaničev, D., Klobučar, G.I.V., Čož-Rakovac, R. (2015): Impact of treated wastewater on organismic biosensors at various levels of biological organization. *Science of The Total Environment* 538:23-37

Torres, N.H., Aguiar, M.M., Ferreira, L.F., Américo, J.H., Machado, A.M., Cavalcanti, E.B., Tornisielo, V.L. (2015): Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environmental Monitoring and Assessment* 187(6): 379

TucDinh, Q., Alliot, F., Moreau-Guigona, E., Eurina, J., Chevreuil, M., Labadie, P. (2011): Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta* 85: 1238-1245

Tuikka, A.I., Schmitt, C., Höss, S., Bandow, N., von der Ohe, P.C., de Zwart, D., Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A. i sur. (2011): Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 123-131

Ulhaq, M., Carlsson, G., Örn, S., Norrgren, L. (2013): Comparison of developmental toxicity of seven perfluoroalkyl acids to zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36:423-426

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006): Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 178-189

Villarroel, M.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu, E. (1999): *Daphnia magna* feeding behaviour after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44:40-46

- von der Ohe**, P.C., Liess, M. (2004): Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 150-156
- Vulliet**, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.-F. (2011): Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environmental Chemistry Letters* 9: 103-114
- Waddy**, S.L., Burrige, L.E., Hamilton, M.N., Mercer, S.M., Aiken, D.E., Haya, K. (2002): Emamectin benzoate induces molting in American lobster, *Homarus americanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59 (7):1096-1099
- Wakamatsu**, T.H., Dogru, M., Tsubota, K. (2008): Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 71: 72-79
- Wallace**, W.G., Estephan, A. (2004): Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology* 69 (3): 289-297
- Warwick**, O.W. (1997): The use of a biomarker to assess the effect of xenobiotic exposure on the freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. PhD thesis, University of Sheffield
- WHO** (2011): Pharmaceuticals in drinking water. World Health Organisation, Ženeva
https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals_20110601.pdf
- WHO** (1993): Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment - concepts and principles. World Health Organisation, Ženeva
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39037/9241571551-eng.pdf;jsessionid=BEBDC388B66ECE7C9ABB88387A90A78A?sequence=1>
- Writer**, J.H., Leenheer, J.A., Barber, L.B., Amy, G.L., Chapra, S.C. (1995): Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by the fecal sterol, coprostanol. *Water Research* 29: 1427-1436
- Yildirim**, N.C., Tanyol, M., Yildirim, N., Serdar, O., Tatar, S. (2018): Biochemical responses of *Gammarus pulex* to malachite green solutions decolorized by *Coriolus versicolor* as a biosorbent under batch adsorption conditions optimized with response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156: 41-47
- Zama**, D., Meraihi, Z., Tebibel, S., Benayssa, W., Benayache, F., Benayache, S., Vlitinck, A.J. (2007): Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian Journal of Pharmacology* 39: 145-150
- Zein**, M.A., McElmurry, S.P., Kashian, D.R., Savolainen, P.T., Pitts, D.K. (2015): Toxic effects of combined stressors on *Daphnia pulex*: Interactions between diazinon, 4-nonylphenol, and wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34: 1145-1153

Zhang, Ya-Nan, Zhu, Xiu-Yun, Wang, Wen-Ping, Wang, Yi, Wang, Lu, Xu, Xiao-Xue, Zhang, Kun, Deng, Dao-Gui (2016): Reproductive switching analysis of *Daphnia similoides* between sexual female and parthenogenetic female by transcriptome comparison. *Scientific Reports* 6: 34241

Internetski izvori:

- 1) URL 1: Cold Spring Harbot Protocols - <http://cshprotocols.cshlp.org>
- 2) URL 2: Python - www.python.org
- 3) URL 3: R project -<https://www.r-project.org/>
- 4) URL 4: Scientific American - <https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/emerging-contaminants-taint-drinking-water-supply/>
- 5) URL 5: Seaborn - <https://seaborn.pydata.org>
- 6) URL 6: United States Environmental Protection Agency (EPA) - www.epa.gov
- 7) URL 7: Water Quality Association (WQA) - <https://www.wqa.org/whats-in-your-water/emerging-contaminants>

ŽIVOTOPIS

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 17. srpnja 1994., Zagreb

OBRAZOVANJE:

- 2016. – 2019. Diplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek
- 2013. – 2016. Preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek
- 2009. – 2013. IV. gimnazija u Zagrebu
- 2001. – 2009. OŠ Mladost, Zagreb

AKTIVNOSTI NA FAKULTETU:

Za vrijeme studija sudjelovala sam na znanstveno-popularnoj manifestaciji Biološkog odsjeka PMF-a „Noć biologije“ 2016. i 2017. godine. Bila sam aktivni član studentske udruge BIUS te voditeljica sekcije za mekušce (2016. – 2018. godine) gdje sam sudjelovala na projektima Istraživačko-edukacijski projekt „Mura-Drava 2016.“ i Istraživačko-edukacijski projekt „Insula Tilagus 2017.“ Udruge studenata biologije – BIUS. Prisustvovala sam nekolicini studentskih simpozija kao pasivni sudionik (Simpoziji studenata bioloških usmjerenja SiSB 2016., 2017. i 2018. godine, Drugi studentski kongres okolišnog zdravlja 2018. godine u Rijeci).