

Biomarkerski odgovori i akumulacija metala u mišićima štuke (*Esox lucius*) iz rijeke Mrežnice kao pokazatelji onečišćenja vode

Omrčen, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:987479>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ema Omrčen

**Biomarkerski odgovori i akumulacija metala
u mišićima štuke (*Esox lucius*) iz rijeke
Mrežnice kao pokazatelji onečišćenja vode**

Diplomski rad

Zagreb, 2022

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, u sklopu HRZZ projekta IP-2019-04-2636 “Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu” (METABIOM), pod mentorstvom dr. sc. Dušice Ivanković te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Lajtner. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Zahvale

Uzorkovanje za ovaj rad provedeno je u sklopu projekta "Biomolekule koje na sebe vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu" (METABIOM), koji je omogućila Hrvatska zaklada za znanost.

Najveće hvala mentorici dr. sc. Dušici Ivanković na vrijednim savjetima, motivaciji i trudu prilikom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala komentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner na pristupačnosti, strpljenju i optimizmu tijekom studija, a pogotovo prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se na pomoći, strpljenju i ugodnom okruženju prilikom izvođenja laboratorijskih analiza članovima Laboratorija za biološke učinke metala, dr.sc. Zrinki Dragun, dr.sc. Vlatki Filipović Marijić, dr.sc. Tatjani Mijošek, Zoranu Kiralju, mag. exp. biol., Sari Šariri, mag. oecol. i Ivani Karamatić, dipl. ing. te hvala ostalim djelatnicima Instituta Ruđer Bošković.

Veliko hvala mojim kolegama i prijateljima na podršci tijekom studiranja, a pogotovo Izabeli, uz čiju je podršku studiranje bilo puno zanimljivije i lakše.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji na bezgraničnoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Biomarkerski odgovori i akumulacija metala u mišićima štuke (*Esox lucius*) iz rijeke Mrežnice kao pokazatelji onečišćenja vode

Ema Omrčen

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Uslijed antropogenog djelovanja, posebice industrije, dolazi do onečišćenja vodenih ekosustava metalima i ostalim zagađivalima, što ostavlja posljedice na vodenu biotu. Štuka (*Esox lucius*) korištena je kao bioindikator u ovom radu. Uzorkovanje je provedeno na dvije postaje, referentnoj (REF), smještenoj oko 2 km uzvodno od Duge Rese i onečišćenoj, smještenoj neposredno ispred nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi (DRT). Analizirane su koncentracije metala i metaloida u mišiću štuke te su praćeni odgovori biomarkera acetilkolinesteraze, ukupnog glutationa, malondialdehida te ukupnih proteina kako bi se dobio uvid o izloženosti štuka onečišćenju. Koncentracije Tl, Se, Mn i Rb u mišiću bile su značajno više na REF postaji, dok su koncentracije toksičnih metala Cd, Pb, Ag, Cr i Ni bile ispod granice detekcije. Razlike u veličinama riba utjecale su na dobivene razlike između postaja za elemente Tl, Mn i As. Ustanovljena je značajno viša koncentracija Bi kod jedinki ženskog, a Co kod muškog spola. Jedino su koncentracije biomarkera malondialdehida pokazale značajnu razliku između postaja, s višim vrijednostima na DRT postaji. Rezultati dobiveni ovim radom donose nove spoznaje o utjecaju industrijskih aktivnosti na vodenu biotu, s naglaskom na ribe te njihove sposobnosti bioakumulacije metala.

(54 stranice, 29 slika, 4 tablice, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: bioakumulacija, industrijsko onečišćenje, ribe, spol, veličina

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dr. sc. Dušica Ivanković, viši znanstveni suradnik, Institut „Ruđer Bošković“

Komentor: Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Doc. dr. sc. Luka Valožić

Prof. dr. sc. Alan Moro

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Biomarker responses and accumulation of metals in the muscles of the northern pike (*Esox lucius*) from the Mrežnica River as indicators of water pollution

Ema Omrčen

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Anthropogenic impact, especially industry, leads to pollution of aquatic ecosystems by metals and other pollutants which affect water biota. Northern pike (*Esox lucius*) is used as the bioindicator in this study. Northern pikes were sampled at two sites, at the reference site located 2 km upstream of Duga Resa (REF) and at the polluted site located directly in front of former textile industry in Duga Resa (DRT). There were analysed the concentrations of metals and metalloids in the muscle of the northern pike and the responses of the biomarkers acetylcholinesterase, total glutathione, malondialdehyde and total proteins were monitored to gain insight into northern pike exposure to pollution. Concentrations of Tl, Se, Mn and Rb were significantly elevated on REF site while the concentrations of toxic metals Cd, Pb, Ag, Cr and Ni were below the limit of detection. Differences in fish sizes on REF and DRT sites significantly affected the obtained differences between sites for elements Tl, Mn and As. Statistically significant higher concentration of Bi was found in females, while Co had higher concentration in males. Among analysed biomarkers, only malondialdehyde concentrations showed a significant difference between sites, with significantly higher values at the DRT site. Results obtained in this study bring new insights into the impact of industrial activities on water biota, with an emphasis on fish and their abilities of metal bioaccumulation.

(54 pages, 29 figures, 4 tables, 63 references, original in: Croatian)

Keywords: bioaccumulation, industrial pollution, fish, sex, size

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dušica Ivanković, PhD, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Co-mentor: Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Assoc. Prof. Petar Kružić, PhD

Asst. Prof. Luka Valožić, PhD

Prof. Alan Moro, PhD

Thesis accepted:

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
1.1. Metali u vodenim ekosustavima, bioakumulacija i procjena onečišćenja.....	1
1.2. Karakteristike štuke.....	2
1.3. Važnost vodenih ekosustava za život riba.....	3
1.4. Štuka kao bioindikatorski organizam.....	3
1.5. Oksidativni stres.....	4
1.6. Biomarkeri.....	4
1.6.1. Acetilkinesteraza (AChE).....	4
1.6.2. Glutation (GSH).....	5
1.6.3. Malondialdehid (MDA).....	5
1.7. Ciljevi rada.....	6
2. MATERIJALI I METODE.....	7
2.1. Područje istraživanja.....	7
2.2. Uzorkovanje i seciranje riba.....	9
2.3. Homogenizacija mišića štuke.....	10
2.4. Razgradnja mišića štuke za potrebe analize metala.....	12
2.5. Određivanje koncentracije metala i metaloida u razgrađenom tkivu mišića štuke....	13
2.6. Određivanje količine ukupnih proteina u S10 frakciji mišića metodom po Lowry-ju	13
2.7. Određivanje malondialdehida (MDA).....	14
2.8. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE).....	16
2.9. Određivanje ukupnog glutaciona (tGSH).....	17
2.10. Obrada rezultata.....	18
3. REZULTATI.....	20
3.1. Biometrijski pokazatelji uzorkovanih organizama.....	20
3.2. Ukupne koncentracije odabranih metala u mišiću štuke.....	21
3.3. Razine molekularnih biomarkera u mišiću štuke	23
3.3.1. Koncentracija proteina.....	23

3.3.2. Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE).....	24
3.3.3. Koncentracija glutationa (GSH).....	25
3.3.4. Koncentracija malondialdehida (MDA).....	25
3.4. Korelacijska analiza.....	26
3.5. Utjecaj veličine jedinki na koncentracije metala i biomarkera.....	30
3.6. Utjecaj spola na koncentracije metala i biomarkera.....	38
3. RASPRAVA.....	40
4. ZAKLJUČAK.....	45
5. LITERATURA.....	47
6. ŽIVOTOPIS.....	54

Popis oznaka i kratica

AchE - engl. *acetylcholinesterase*, acetilkolinesteraza

ASCh - acetiltiokolin jodid

BSA - engl. *bovine serum albumin*, albumin goveđeg seruma

DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

GR - glutation-reduktaza

GSH - reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation, glutation disulfid

HR ICP-MS - engl. *High Resolution Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, maseni spektrometar visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom

LC - engl. *Least Concern*, najmanje zabrinjavajući

LOD - engl. *limit of detection*, granica detekcije

MDA - malondialdehid

MS - trikain metan sulfonat

NADPH - reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

SSA - sulfosalicilna kiselina

TBA - 2-tiobarbiturna kiselina

TCA - trikloroctena kiselina

TEP - 1,1,3,3- tetraetoksipropan

TNB - 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina

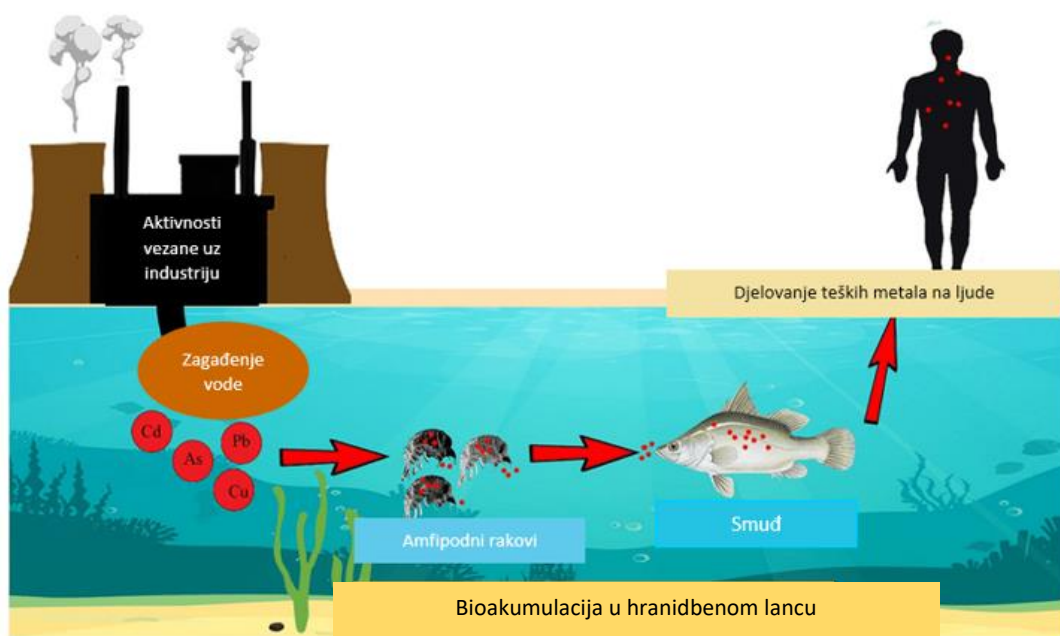
TP – ukupni proteini

1. UVOD

1.1. Metali u vodenim ekosustavima, bioakumulacija i procjena onečišćenja

U vodenom okolišu metali su uvijek prisutni, a njihova je koncentracija uvjetovana prirodnim procesima (npr. procesi erozije tla i stijena, vulkanske erupcije) i različitim antropogenim aktivnostima (Gaillardet i sur. 2003). Ekotoksični metali su oni elementi koji pri niskim koncentracijama nisu štetni, no ukoliko dođe do povećanja njihove koncentracije iznad dozvoljene vrijednosti postaju opasni za organizme koji su izloženi onečišćenju tim elementima. Takvi se metali u pravilu u okolišu nalaze u malim koncentracijama, ali uslijed antropogenog djelovanja dolazi do njihove preraspodjele te se pojavljuju lokalizirana područja sa visokim koncentracijama ovih elemenata (Coombs 1980). Uslijed antropogenih aktivnosti kao što su poljoprivreda, industrija, komunalne otpadne vode i dr. dolazi do zagađenja vode ekotoksičnim metalima. Zbog nemogućnosti njihove biorazgradnje, metali koji su jednom uneseni u okoliš u njemu ostaju trajno (Cukrov i sur. 2008).

Ribe zauzimaju različite trofičke razine hranidbenog lanca vodenog okoliša, dok se predatorske vrste riba poput štuke nalaze na njegovom vrhu te mogu u svom organizmu akumulirati značajnu količinu teških metala i ostalih štetnih tvari (Aktar i sur. 2011). Količina akumuliranih metala ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su dob, veličina i spol ribe, a jednako su važni i geografski položaj, ponašanje pri hranjenju te reproduktivni ciklus (Bawuro i sur. 2018). Štetne tvari ribe u svoj organizam mogu unijeti na dva načina: putem škrga, u slučaju kada su kemikalije otopljene u vodi ili putem crijevne sluznice, u slučaju gutanja zagađenih čestica hrane (Streit 1998). Na primjeru smuđa (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758) prikazana je bioakumulacija u hranidbenom lancu koji čine amfipodni rakovi, smuđ i čovjek (Slika 1). Otpadne vode industrijskih pogona uzrokuju zagađenje vode, amfipodni rakovi konzumiraju vodu zagađenu štetnim metalima te se smuđ njima hrani. Čovjek se kao krajnji konzument hrani smuđem te u ljudskom tijelu dolazi do bioakumulacije metala što dovodi do štetnih posljedica za ljudsko zdravlje.



Slika 1. Prikaz bioakumulacije u hranidbenom lancu na primjeru smuđa (*Sander lucioperca*).
(preuzeto i prilagođeno prema URL 1)

Procjena onečišćenja prirodnih voda metalima temelji se na određivanju koncentracije metala u vodi i sedimentu (kemijski monitoring) i živim organizmima (biološki monitoring) (Zhou 2008). Nedostatci kemijskog monitoringa vode su dosta niske koncentracije metala u vodi, što otežava njihovu detekciju i to što odražava stanje samo u trenutku uzorkovanja. Koncentracija metala u sedimentu bolji je pokazatelj dugoročnog onečišćenja, veća je od one u vodi, ali ne daje informaciju o bioraspoloživoj količini metala. Biomonitoring ne daje samo informaciju o količini apsorbiranog metala već i o njihovom djelovanju na organizam (Hamza-Chaffai 2014).

1.2. Karakteristike štuke

Štuka (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) jedina je vrsta riba iz porodice Esocidae koja živi u prostoru Hrvatske. Nalazimo ju u jadranskom slijevu gdje naseljava rijeku Gacku, jezero Vrana na otoku Cresu te vode Istre. Što se tiče dunavskog slijeva, prisutna je u njegovim nizinskim vodama. Ova vrsta je također prisutna u Nacionalnom parku Krka (URL 2) te u značajnom krajobrazu Prološko blato, gdje je invazivna (URL 3). Što se tiče statusa zaštite na razini Europe, štuka pripada u

kategoriju najmanje zabrinjavajuća (LC) (URL 4). Po gospodarskoj vrijednosti štika predstavlja vrlo važnu ribu, a njezin je rast uvjetovan količinom dostupne hrane te osobinama vode. Dužina joj iznosi 46 - 51 cm, a od morfoloških posebnosti ističu se jedna dorzalna peraja te glava koja izgleda poput pačjeg kljuna. Oviparna je vrsta te jaja polaže na submerznu vegetaciju (URL 5). Kod štuke se već u ranoj fazi, kada joj dužina tijela iznosi oko četiri centimetra, počinje javljati kanibalizam. Na prehranu štuke tijekom godine mogu utjecati: vodostaj, temperatura vode, dob, spolna zrelost, itd. Zabilježeno je da štuke hranu više uzimaju u proljeće nakon mrijesta, dok je najmanji unos hrane ljeti (Habeković 1998). Morfološke značajke štuke ukazuju na to da se njezina prehrana uglavnom temelji na ribama, a nešto manje na beskralježnjacima poput amfipodnih rakova (Chapman i sur. 2011).

1.3. Važnost vodenih ekosustava za život riba

Vodeni ekosustav kao stanište brojnih organizama na njih utječe u vidu svojih fizikalno-kemijskih svojstava. Ta svojstva mogu stvoriti uvjete u kojima će neka vrsta sačuvati karakterističnu izmjenu tvari, pa čak i ostvariti napredak. U tom slučaju govorimo o optimalnim uvjetima za život organizama. Odgovor organizama na promjene životnih uvjeta bitan je za razumijevanje trenutnog stanja vode u kojoj se ti organizmi nalaze. Prekomjerno izlaganje organizama neželjenim vrijednostima određenih okolišnih parametara, kao što su temperatura, kisik, tvrdoća vode, organska tvar, pH ili pak nekom zagađivalu, može rezultirati bolešću (Čož-Rakovac i sur. 2000).

1.4. Štika kao bioindikatorski organizam

Štika se zbog nekoliko svojih obilježja smatra dobrim bioindikatorom u slatkovodnim ekosustavima. Među njima se ističe njezina brojnost, prisutnost na svim slatkovodnim područjima i u bočatim vodama, kao i visoka tolerancija na različite ekološke uvjete (Craig 2008). Također je bitan položaj štuke u hranidbenom lancu, s obzirom na činjenicu da je vršni predator. Način prehrane, promjene istog s rastom i razvojem ribe te solitarnost i teritorijalnost ove vrste se isto tako smatraju obilježjima pogodnim za korištenje u svrhu bioindikacije (Nilsson i sur. 2019).

1.5. Oksidativni stres

Neravnoteža pro- i antioksidansa nerijetko dovodi do pojave oksidativnog stresa koji može rezultirati oštećenjem stanica i tkiva. Ova pojava češća je u organima i tkivima kojima je za funkcioniranje bitan protok energije i prisutnost metaboličkih procesa, kao što su krvne stanice, jetra te srce (Puppel i sur. 2015).

1.6. Biomarkeri

Biomarker predstavlja promjenu u biološkom odgovoru organizma koja se javlja uslijed izloženosti onečišćenju, odnosno štetnim tvarima, poput otrova ili kemikalija. Odgovor se može očitovati u vidu molekularne, stanične, biokemijske ili biheviorističke promjene (Walker 1998). U procjeni izloženosti utjecaju okolišnih čimbenika dijele se na biomarkere izloženosti i biomarkere učinka (Wild 2008).

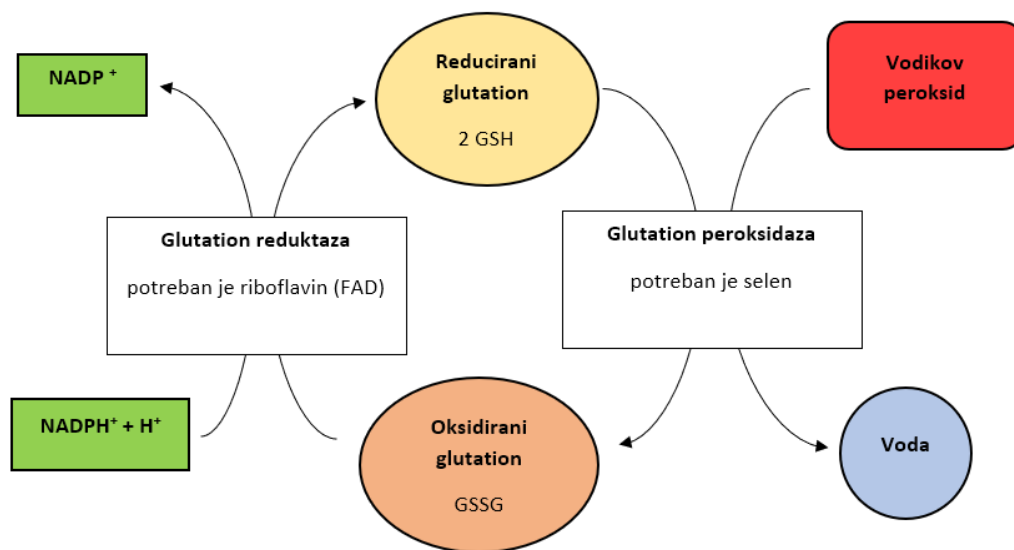
1.6.1. Acetilkinesteraza (AChE)

Acetilkinesteraza je enzim koji sudjeluje u hidrolizi neurotransmitera acetilkolina, a pripada porodici enzima kolinesteraza (ChE). Uglavnom se nalazi unutar neuromuskularnih spojeva, odnosno na sinapsama gdje dolazi do hidrolize acetilkolina na acetat i kolin. Ovaj enzim ima najveću ulogu u završetku sinaptičkog prijenosa impulsa te je neophodan za normalnu funkciju središnjeg i perifernog živčanog sustava. Molekula acetilkolinesteraze sastoji se od dvije proteinske domene: katalitičke domene i terminalnog peptida (Park i Arvan 2004), dok je acetyl-β-metil kolin specifičan supstrat za ovaj enzim (Simeon 1972).

Navedeni enzim koristi se u ekotoksikološkim istraživanjima kao biomarker neurotoksičnosti na način da se promatra njegova aktivnost prilikom izlaganja organizma štetnim tvarima (Lionetto 2013). Inhibicija AChE smatra se posebno dobrim biomarkerom za izloženost organofosfatnim i karbamatnim pesticidima, ali i drugi onečišćivači prisutni u vodenim ekosustavima poput deterdženata i metala također mogu imati utjecaj na aktivnost ovog enzima (Patel 2019).

1.6.2. Glutation (GSH)

Glutation je tripeptidni tiol koji se nalazi u visokim koncentracijama gotovo u svim stanicama, a ima važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Smatra se da GSH djeluje kao prva crta obrane stanice od metala koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju, dok još nije došlo do indukcije metalotioneina (Canesi i sur. 1999). Prisutan je u citosolu i organelima, a javlja se u dva oblika - oksidiranom (GSSG) i reduciranom (GSH). Njihov omjer ukazuje na razinu oksidativnog stresa prisutnog u stanicama, ukoliko je omjer GSSG-GSH veći - radi se o većem oksidativnom stresu (Meister 1994). Enzim glutacion-reduktaza prevodi GSSG natrag u GSH (Slika 2).



Slika 2. Ciklus glutaciona. (Preuzeto i prilagođeno prema URL 5).

1.6.3. Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid je kemijski spoj koji se u istraživanjima za potrebe biomonitiranja koristi kao biomarker oksidativnog stresa (Del Rio i sur. 2005). Razina tog toksičnog aldehida pokazatelj je peroksidacije lipida, odnosno niza reakcija u kojima se molekule lipida postepeno oksidiraju (Zhengwei 2005). Ovisno o agregacijskom stanju, malondialdehid se javlja u različitim oblicima, pa je tako u neutralnoj otopini u obliku nereaktivnog enolatnog iona (Roede i Fritz 2015).

1.7. Ciljevi rada

Unos različitih onečišćivača, uključujući metale, u vodeni ekosustav uslijed različitih vrsta antropogenih aktivnosti (industrija, rudarenje, poljoprivreda) predstavlja važan okolišni problem. Među različitim industrijama, tekstilna industrija predstavlja značajan izvor onečišćenja slatkih voda različitim štetnim tvarima, uključujući metale (Domingues i sur. 2020). Primjer negativnog utjecaja tekstilne industrije na slatkovodne ekosustave nalazimo u rijeci Mrežnici koja je više od sto godina bila izložena otpadnim vodama tvornice pamučnog tekstila u Dugoj Resi (Frančišković-Bilinski i sur. 2017). Iako ova tvornica nije aktivna gotovo dva desetljeća, onečišćujuće tvari prethodno nakupljene u sedimentima i dalje mogu predstavljati prijetnju za vodenu biotu. Stoga je osnovni cilj ovoga istraživanja bio procijeniti izloženost, kao i moguće štetne posljedice povećane izloženosti metalima u štuke (*E. lucius*) iz rijeke Mrežnice, kao reprezentativnog bioindikatorskog organizma, na mjestu dugogodišnje kontaminacije rijeke otpadnim vodama pamučne industrije u Dugoj Resi.

Specifični ciljevi rada bili su sljedeći:

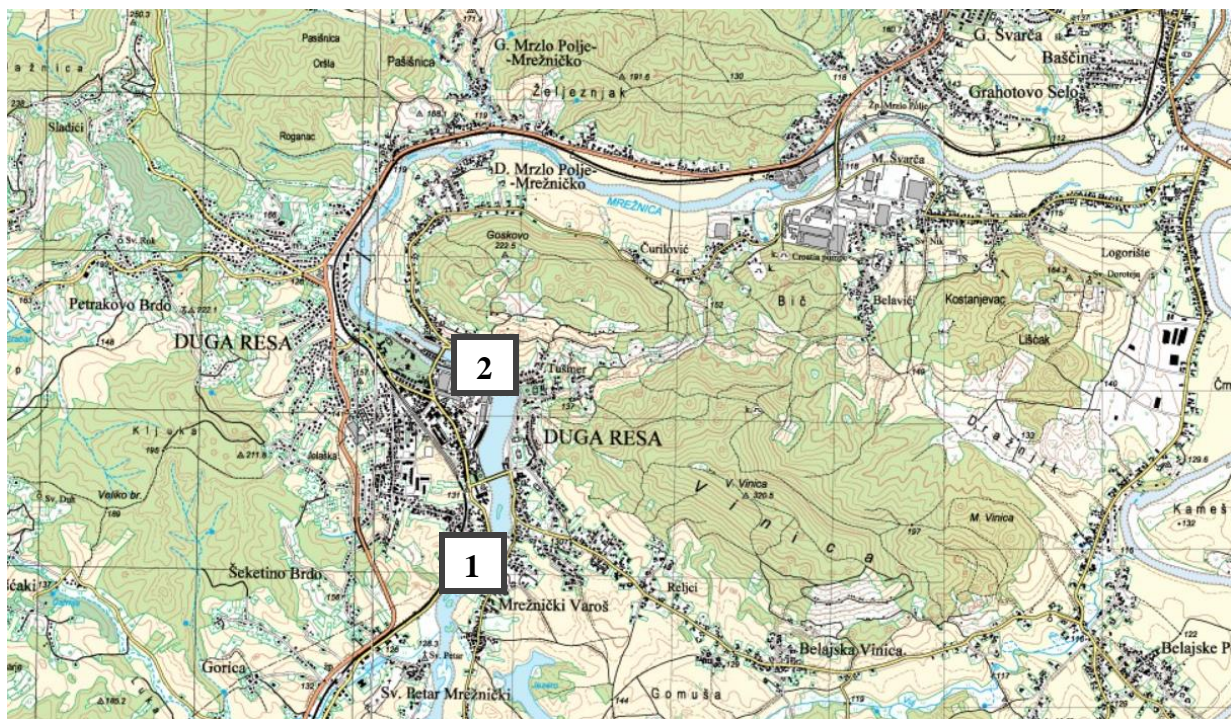
- istražiti je li dugogodišnja kontaminacija rijeke Mrežnice otpadnim vodama pamučne industrije u Dugoj Resi dovela do povećane bioakumulacije odabranih metala i metaloida u mišićima štuke (*E. lucius*), kao reprezentativnog bioindikatorskog organizma;
- procijeniti moguće štetne učinke onečišćujućih tvari na biotu određivanjem različitih klasa molekularnih biomarkera u mišićima štuke: aktivnosti AchE kao biomarkera neurotoksičnosti, razine ukupnih proteina kao biomarkera općeg stresa, tGSH kao biomarkera antioksidativnog kapaciteta, te MDA kao biomarkera oksidativnog stresa;
- ispitati povezanost biomarkerskih odgovora s koncentracijama analiziranih elemenata u mišićima riba.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja

Rijeka Mrežnica krška je rijeka koja izvire zapadno od Slunja, a kod Karlovca se ulijeva u rijeku Koranu čiji je lijevi pritok. Dužina Mrežnice iznosi 64 km, dok njezino porječje ima površinu od 1076 km². Ovu rijeku karakterizira prisutnost 93 sedrene barijere te stotinjak slapova, od kojih se ističu slap kod Milkovića i Šušnjar (Maradin 2007). Prisutnost sedre uvjetovana je kemijskim sastavom podzemnih voda koji ovisi o geološkoj podlozi i karbonatnoj građi, dok su na nastanak slapova utjecali klimatski uvjeti, morfologija te blagi pad. Rijeka Tounjčica predstavlja naj snažniji pritok Mrežnice, duž čijeg toka se nalazi veliki broj izvora, od kojih je najvažniji Lisičije vrelo (Hršak 2010).

Područje istraživanja obuhvaćalo je donji dio toka rijeke Mrežnice, jer je upravo u ovom dijelu toka rijeka Mrežnica dugo bila izložena visokom stupnju onečišćenja otpadnim vodama podrijetlom iz različitih industrija (Francišković-Bilinski 2017). Uzorkovanje je provedeno na dvije postaje, referentnoj (REF), smještenoj oko 2 km uzvodno od grada Duge Rese (Slika 3 i Slika 4A) i onečišćenoj, smještenoj neposredno ispred nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi (DRT), (Slika 3 i Slika 4B) u proljeće 2021. godine. Istraživanje iz ovog rada provedeno je u sklopu HRZZ projekta: “Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu” (METABIOM).



Slika 3. Karta područja istraživanja (mjerilo 1:25000) s označenim mjestima uzorkovanja. 1 – referentna postaja (REF), 2 - postaja Duga Resa tvornica (DRT) (preuzeto i prilagođeno prema URL 7).



Slika 4. Lokalitet uzorkovanja na rijeci Mrežnici, referentna postaja (REF) (A) i postaja Duga Resa tvornica (DRT) (B). (Autor fotografija: Zrinka Dragun).

2.2. Uzorkovanje i seciranje riba

Za ovo je istraživanje kao bioindikatorski organizam odabrana štika (*Esox lucius* Linnaeus, 1758; Slika 5), kao reprezentativna vrsta riba za rijeku Mrežnicu.

Uzorkovanje štika (Dozvola Ministarstva poljoprivrede od 24. veljače 2021. godine za ribolov radi znanstvenog istraživanja Klasa: UP/I-324-02/21-01/04; Urbroj: 525-13/0733-21-2) obavljeno je pomoću elektroagregata Hans Grassl, EL63 II GI, 5,0 KW, Honda GX270, 300/600 V max., 27/15A max., a u skladu s hrvatskim standardom HRN EN 14011 (2005) (Dragun i sur. 2013). Na referentnoj postaji ulovljeno je 16, a na onečišćenoj 17 jedinki štika.



Slika 5. Odabrani bioindikatorski organizam, štika (*Esox lucius* Linnaeus, 1758). (Autor fotografije: Zrinka Dragun).

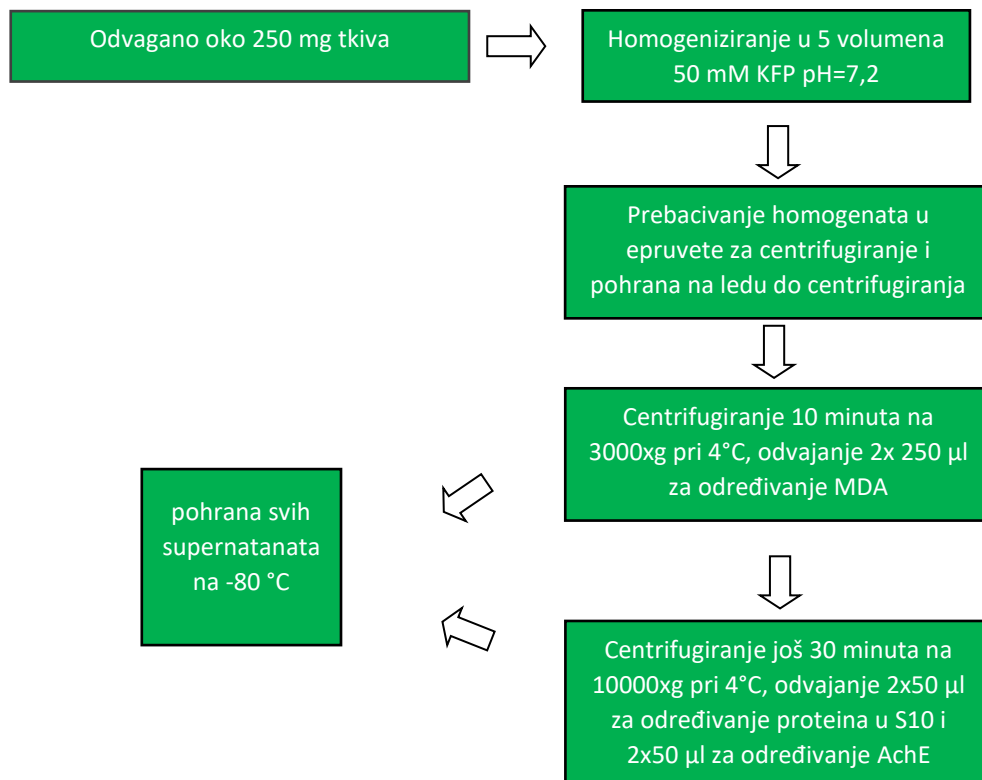
Nakon izlova ribe su držane u plastičnom spremniku, u oksigeniranoj riječnoj vodi uzetoj na mjestu uzorkovanja, a prije daljnje obrade i usmrćivanja omamljene su anestetikom trikain metan sulfonatom (MS 222, Sigma Aldrich, SAD). Ribama su prvo određeni osnovni biometrijski parametri, standardna dužina (mjerena od početka glave do početka repne peraje, izražena u cm) i ukupna masa (izražena u g). Nakon usmrćivanja, vizualnim pregledom gonada određen je spol te je izvagana masa gonada (g), a potom su seciranjem iz područja leđa, neposredno iza stražnjeg ruba škržnog poklopca uzeti uzorci mišića za analize biomarkera i akumulacije metala. Uzorci su

odmah nakon sekcije pohranjeni u tekući dušik, a nakon toga su do analize držani u zamrzivaču na -80 °C. Iz mjerenih osnovnih biometrijskih parametara i mase gonada naknadno su izračunati Fultonov kondicijski indeks (FCI) i gonadosomatski indeks (GSI). Fultonov kondicijski indeks je izračunat prema formuli: $FCI (\%) = (\text{ukupna masa (g)}/\text{standardna dužina}^3 (\text{cm})) \times 100$, dok je za izračun gonadosomatskog indeksa korištena sljedeća formula: $GSI (\%) = (\text{masa gonada (g)}/\text{ukupna masa (g)}) \times 100$.

2.3. Homogenizacija mišića štuke

Svaki uzorak mišića podijelila sam u tri dijela, za određivanje ukupne koncentracije metala, određivanje biomarkera MDA, AchE i ukupnih proteina te za određivanje ukupnog glutaciona (GSH).

Postupak pripreme mišićnog tkiva za određivanje biomarkera ukratko je prikazan na Slici 6. U staklenim posudicama sam izvagala oko 250 mg tkiva, a neke sam uzorke po potrebi isjeckala škarama. U posudice sam dodala pufer za homogenizaciju (50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,2), koji je prethodno pohranjen u ledenoj kupelji, u omjeru 5:1. Tu sam smjesu prelila u staklenu epruvetu za homogeniziranje te ju homogenizirala na 4000 okretaja u minuti pomoću homogenizatora s teflonskim batićem (Potter-Elvehjem GLASS COL, SAD) (Slika 7). Dobiveni homogenat prelila sam u ohlađene epruvete za centrifugiranje i pohranila na ledu do centrifugiranja. Homogenate sam prvo centrifugirala (Avanti J-E Beckman Coulter, SAD) 10 minuta na 3000xg pri 4 °C te sam za određivanje MDA od dobivenog supernatanta (stanična frakcija S3) odvojila 2x250 µl. Nakon toga, supernatante sam centrifugirala još 30 minuta na 10000xg pri 4 °C. Dobiveni supernatant (stanična frakcija S10) prebacila sam u prethodno ohlađene epruvete te sam odvojila 2x50 µl za određivanje proteina u S10 i 2x50 µl za određivanje AchE. Pohranila sam sve supernatante na -80 °C.



Slika 6. Shematski prikaz postupka pripreme mišićnog tkiva za analizu proteina, malodialdehida (MDA) i acetikolinesteraze (AChE).



Slika 7. Homogeniziranje mišićnog tkiva pomoću homogenizatora s teflonskim batićem. (Autor fotografije: Zoran Kiralj).

2.4. Razgradnja mišića štuke za potrebe analize metala

Pripremila sam plastične epruvete od 10 ml koje su prethodno bile oprane u 10 % HNO_3 (Kemika, p.a.), izvagala sam oko 0,5 g mišića direktno u epruvetu i dodala 2,25 ml koncentrirane HNO_3 (*Rotipuran Supra 69 %*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka) i 0,75 ml 30 % H_2O_2 (*Suprapur*, Merck, Njemačka) (Slika 8A). Nakon toga, epruvete sam stavila grijati u laboratorijski sušionik (Slika 8B) 3,5 sata na 85 °C. Nakon hlađenja, epruvete sam dobro promiješala na vrtložnoj miješalici (MS1, Ika-Works, Njemačka) te potom sadržaj adekvatno razrijedila za mjerenje na ICP-MS u digestoru. Za mjerenje elemenata u tragovima razgrađeno tkivo sam 5 puta razrijedila s Milli-Q vodom u duplikatu (500 μl razgrađenog tkiva + 25 μl In ($1 \mu\text{g L}^{-1}$, Fluka, Njemačka) + 1,975 ml Milli-Q), da bi koncentracija kiseline bila 5 %. Nakon dodavanja In i vode promiješala sam epruvete na vrtložnoj miješalici i pohranila ih do analize na 4 °C. Razgradnju mišića provela sam u suradnji s dr. sc. Vlatkom Filipović Marijić i dr. sc. Tatjanom Mijošek sa Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.



Slika 8. Razgradnja mišića štuke za potrebe analize metala, dodavanje kiseline (A) (Autor fotografije: Tatjana Mijošek) i grijanje u sušioniku (B).

2.5. Određivanje koncentracije metala i metaloida u razgrađenom tkivu mišića štuke

Koncentracije metala određene su u mišićnom tkivu koje je prethodno razgrađeno postupkom opisanim u poglavlju 2.3. Mjerenje je provedeno na masenom spektrometru visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom, HR ICP-MS Element 2 (Thermo Finnigan, Njemačka) u suradnji s dr. sc. Zrinkom Dragun sa Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.

U ovom istraživanju analizirano je ukupno 16 metala i metaloida. Vanjska kalibracija mjerenja provedena je pripremom odgovarajućih standarda iz multielementne standardne otopine za elemente u tragovima (Analytika, Češka Republika) s dodatkom Rb (Sigma-Aldrich, SAD) i Cs (Fluka, Njemačka) i standardne otopine koja sadrži Ag (Fluka, Njemačka). Standardi su pripremani u 1,3 % HNO₃ (Suprapur, Merck, Njemačka) uz dodatak 1 µg/l indija (Fluka, Njemačka) kao internog standarda. Točnost mjerenja testirana je kontrolnim uzorkom za mjerenje metala u tragovima (QC trace metals, kataloški broj 8072, UNEP/GEMS, Burlington, Kanada).

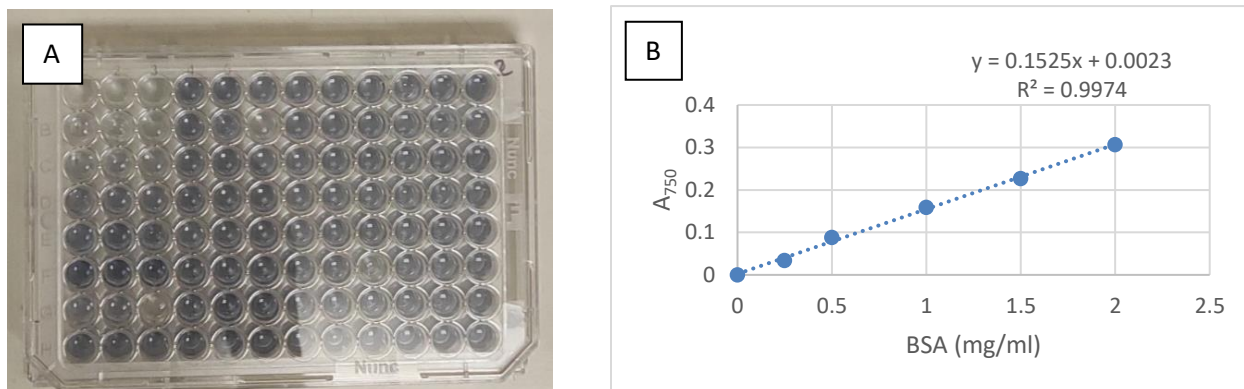
Mjerenje koncentracija ⁸²Se, ⁸⁵Rb, ¹⁰⁹Ag, ¹¹¹Cd, ¹³³Cs, ²⁰⁵Tl, ²⁰⁸Pb i ²⁰⁹Bi provedeno je na niskoj rezoluciji; ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu i ⁶⁶Zn na srednjoj rezoluciji; a ⁷⁵As na visokoj rezoluciji.

Granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u mišićnom tkivu izračunate su kao tri standardne devijacije deset mjerenja metala/metaloida u slijepom uzorku razgrađenom istim postupkom kao i uzorci tkiva. Granice detekcije iznosile su (u ng/g tkiva): Se 3,463, Rb 0,090, Ag 0,014, Cd 0,079, Cs 0,014, Tl 0,003, Pb 1,703, Bi 0,321, Cr 0,139, Mn 0,797, Fe 22,244, Co 0,020, Ni 1,693, Cu 1,331, Zn 7,627 i As 0,320.

2.6. Određivanje količine ukupnih proteina u S10 frakciji mišića metodom po Lowry-ju

Prije određivanja proteina napravila sam kalibraciju koja podrazumijeva pripremu osnovne otopine BSA (albumin iz goveđeg seruma; Serva, Feinbiochemia, Njemačka) 5 mg/ml, tj. otopila sam 10 mg BSA u 2 ml pufera. Zatim sam iz osnovne otopine pripremila određene koncentracije standarda kako bi se izradio kalibracijski pravac (0 (slijepa proba, pufer), 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mg/ml). Uzorke sam razrijedila 5 puta s puferom (KFP pH 7,2) te sam u čistu i suhu mikroploču otpipetirala po 5 µl slijepa probe, otopina standarda ili uzorka, a zatim u svaku jažicu dodala 25 µl

Reagens A i 200 μ l Reagens B. Lagano sam protresla ploču kako bi se reagensi pomiješali te ostavila stajati 15 minuta prekriveno alufolijom. Nakon 15 minuta očitala sam apsorbanciju na 750 nm (A_{750}) pomoću fotometra za mikroploče (Infinite M200, Tecan, Švicarska). U programu Excel napravljen je kalibracijski pravac (Slika 9B) prema kojem su izračunate koncentracije proteina u uzorcima. Određivanje sam napravila u dva nezavisna razrjeđenja uzorka, a svaki poduzorak, odnosno standard, nanijela sam na pločicu u triplikatu.



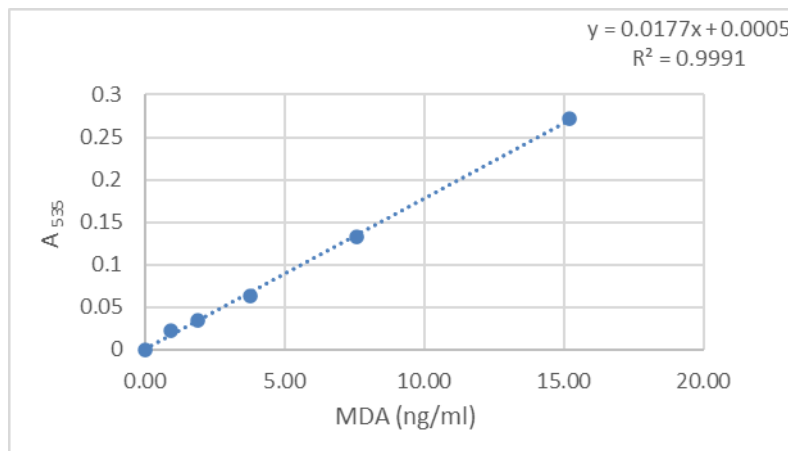
Slika 9. Određivanje proteina u S10 frakciji mišića štuke, mikroploča sa slijepom probom, standardima i uzorcima (A) i kalibracijski pravac korišten za izračun koncentracije proteina (B).

2.7. Određivanje malondialdehida (MDA)

Određivanje koncentracije MDA provela sam prema metodi opisanoj u radu Botsoglou i sur. (1994), uz neke prilagodbe. Pri određivanju MDA koristila sam trikloroctenu kiselinu (TCA, Kemika, Hrvatska); 2-tiobarbiturnu kiselinu (TBA, Alfa Aesar, SAD); 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP, Sigma-Aldrich, SAD); butilirani hidroksitoluen (BHT, Sigma-Aldrich, SAD) te otopine 50 mM kalij-fosfatnog pufera (KFP) pH 7,2 i 1N HCl s tim da je otopine TCA (10 %), TBA (0,67 %) i BHT (1 %) potrebno uvijek pripremiti svježe. Tkivo sam homogenizirala u 5 volumena KFP te sam homogenate 10 minuta centrifugirala na 3000xg pri 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojila sam 2x 250 μ l supernatanta (S3) te ih do analize pohranila na -80 °C (Poglavlje 2.3., Slika 6). Postupak određivanja MDA provodi se u dva koraka. U prvom koraku razrijedila sam 200 μ l osnovne otopine BHT i 19.8 ml TCA (osnovna otopina BHT razrijeđena 100x) te sam dodala 0,5 ml te

smjese u 250 μ l S3, koji sam prethodno odmrznula. Dobivenu smjesu sam promiješala na vrtložnoj mješalici (MS1, Ika-Works, Njemačka) oko 30 sekundi i stavila na led 15 min. Zatim sam centrifugirala 15 min na 4000xg pri 4 °C u Biofuge Fresco centrifugi (Kendro, SAD) te potom odvojila 0,75 ml supernatanta (SN) u Eppendorf epruvete od 1,5 mL, kojima sam prethodno, pomoću igle, probušila rupice na poklopcu. U drugom koraku sam na 0,75 ml SN dodala 0,5 ml TBA, dobivenu smjesu promiješala na vrtložnoj mješalici oko 10 sekundi te grijala u grijaćem bloku (Dri Block Heater, Techne (Cambridge), Ltd. UK) 30 minuta na 100 °C. Uzorke sam kratko stavila na led da se ohlade, a kasnije sam ih držala na sobnoj temperaturi. Prebacila sam 200 μ l uzorka/standarda u triplicatu u mikroploču i mjerila apsorbanciju na 535 nm (A_{535}) u fotometru Infinite M200 (Tecan, Švicarska).

Za izradu kalibracijskog pravca priredila sam otopine MDA standarda u homogenizacijskom puferu (KFP pH 7,2) u rasponu 0,95-15 nmol/ml te slijepu probu (homogenizacijski pufer). Osnovnu otopinu standarda (3,035 mM MDA) pripremila sam iz 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP, Sigma-Aldrich, SAD). U tikvici sam pomiješala 37 μ L TEP s 0,5 ml 1 N HCl, dopunila tikvicu Milli Q vodom do 50 mL i grijala na 50 °C tijekom 60 minuta. Zagrijavanjem u kiselim uvjetima, TEP hidrolizom prelazi u MDA. Slijepu probu i standarde tretirala sam na isti način kao i uzorke te sam uz svaku seriju uzoraka priredila i set standarda. Koncentracije MDA izražene su u nmol/g svježe mase mišića, a izračunala sam ih prema kalibracijskom pravcu kojeg sam izradila u programu Excel (Slika 10).



Slika 10. Kalibracijski pravac prema kojem su određene koncentracije malodialdehida (MDA) u mišiću štuke.

2.8. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE)

Određivanje aktivnosti AChE provela sam metodom po Ellmanu (Ellman i sur. 1961), prema proceduri prilagođenoj za mikroploču. Za određivanje je korištena stanična frakcija mišićnog tkiva dobivena nakon centrifugiranja homogenata na 10000xg tijekom 30 min (S10 frakcija) (Poglavlje 2.3 i Slika 6). Za izvođenje metode pripremila sam sljedeće otopine: 1) 100 mM kalijfosfatni pufer, pH 7,4; 2) 11,4 mM DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), Sigma-Aldrich, SAD) – za pripremu radne otopine DTNB (0,114 mM), osnovnu otopinu razrijedila sam 100x; 3) 10 mM ASCh (acetiltiokolin jodid, Sigma, SAD). U jažicu sam prvo dodala 5 μ l slijepe probe (homogenizacijski pufer KFP pH 7,2) odnosno uzorka (S10 frakcija mišića), a nakon toga sam dodala 250 μ l radne otopine DTNB, pločicu prekrila alufolijom i ostavila stajati 15 min na sobnoj temperaturi. Neposredno prije mjerenja na fotometru, višekanalnom pipetom dodala sam 25 μ l acetiltiokolin jodida te čitala apsorbancu na 412 nm svake minute tijekom 5 minuta.

Aktivnost enzima izražena je po koncentraciji ukupnih proteina u S10 frakciji ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina), a izračunata je korištenjem molarog ekstinkcijskog koeficijenta DTNB na 412 nm ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.9. Određivanje ukupnog glutationa (tGSH)

Za određivanje koncentracije tGSH koristila sam DTNB-GSSG reduktaza reciklirajući spektrofotometrijski test (Tietze 1969) koji slijedi proceduru opisanu u Akerboom i Sies (1981) uz neke prilagodbe, detaljno opisane u radu Mijošek i sur. (2019). Za ovu metodu ključna je reakcija GSH s DTNB koja uzrokuje pojavu žuto obojenog TNB-a (5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina) koji je proporcionalan koncentraciji GSH u uzorku i može ga se kvantificirati na 412 nm.

Za određivanje GSH uzorke je potrebno homogenizirati u kiselom mediju. Kao kiseli medij u metodi je korištena 5%-tna otopina sulfosalicilne kiseline (SSA, Kemika, Zagreb). Svrha homogenizacije u SSA je dvojak, uklanjanje proteina i inhibicija enzima gama-glutamyltransferaze koji može dovesti do gubitka GSH.

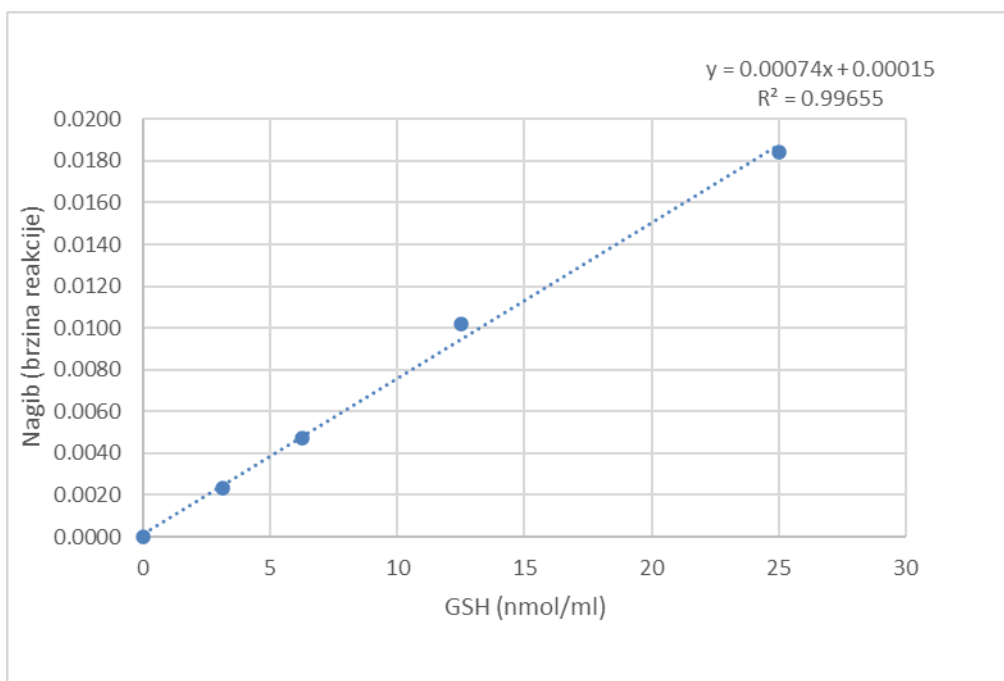
Tkivo sam usitnila, izvagala oko 60 mg i homogenizirala u 5 volumena ledene 5 % SSA u homogenizatoru s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Elvehjem GLASS COL, SAD). Dobiveni homogenat prebacila sam u ohlađene Eppendorf epruvete od 1,5 ml i ostavila na ledu 10 minuta kako bi došlo do taloženja proteina. Uzorke i homogenat držala sam na ledu za vrijeme cijelog postupka te sam ih centrifugirala 10 minuta u Biofuge Fresco centrifugi na 10000xg pri 4 °C. Dobivene supernatante prelila sam u čiste ohlađene epruvete i pohranila na -80 °C do analize.

Visoka koncentracija SSA mijenja pH te dolazi do interferiranja s reakcijom GSH u testu, stoga je prije analize supernatante bilo potrebno dodatno razrijediti pet puta s Milli Q vodom da bi se dobila koncentracija SSA u uzorku 1 %. Za kvantitativno određivanje GSH kao referentni standard korišten je reducirani glutation (GSH, Sigma, SAD). Standarde sam pripremila u 1 % SSA. Iz osnovne otopine GSH (10 mM) pripremljeni su standardi u rasponu koncentracija 3,125-25 nmol/ml.

Za analizu sam pripremila svježe otopine: 1) 100 mM kalij-fosfatni pufer uz dodatak 1 mM EDTA, pH 7,5; 2) osnovna otopina DTNB (3,79 mM); 3) osnovna otopina glutation reduktaze (GR, 6 U/ml, Sigma, SAD) i 4) osnovna otopina NADPH (1,92 mM). Neposredno prije analize, iz osnovnih otopina napravljene su radna otopina DTNB (0,102 mM) + GR (0,162 mM) i radna otopina NADPH (0.192 mM)

U pločicu sam dodala po 20 µl slijepe probe (1 % SSA), standarda odnosno uzorka, nakon čega sam višekanalnom pipetom dodala 150 µl radne otopine DTNB+GR po jažici, promiješala pločicu

i ostavila 5 min na sobnoj temperaturi prekriveno alufolijom. Zatim sam višekanalnom pipetom dodala 50 μ l po jažici radne otopine NADPH i odmah očitala A na 412 nm (A_{412}). Odredila sam brzinu reakcije za standarde, korigirala za brzine reakcije u slijepoj probi i izradila kalibracijsku krivulju u programu Microsoft Excel. Isto sam napravila za uzorke te sam iz jednadžbe pravca izračunala koncentracije GSH u uzorcima (Slika 11).



Slika 11. Kalibracijski pravac korišten za određivanje ukupnog glutationa (tGSH).

2.10. Obrada rezultata

Rezultate mjerenja obradila sam opisnim statističkim metodama (aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD), raspon između najmanje i najveće vrijednosti (min-max)) te prikazala slikovno ili u tablicama. Sve izračune napravila sam u programu Microsoft Excel 365 a za izradu grafičkih prikaza i statističku obradu podataka koristila sam programe Microsoft Excel 365 i STATISTICA 8.0. Za usporedbu mjerenih parametara između postaja REF i DRT te za usporedbu spola, koristila sam t-test za nezavisne uzorke, kao statistički parametrijski test za testiranje značajnosti razlike u

slučajevima kada se uspoređuju dva nezavisna uzorka. Usporedbu različitih kategorija veličina riba provela sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) kao statističkog parametrijskog testa koji se koristi u slučajevima kada se uspoređuje više od dva nezavisna uzorka. U slučaju kada je ANOVA bila značajna ($p < 0,05$), napravljen je LSD *post hoc* test višestrukih usporedbi kako bi se odredilo koje se od testiranih kategorija međusobno statistički značajno razlikuju. Za testiranje mogućeg doprinosa razlike u veličini riba između dviju postaja na ustanovljene razlike u koncentracijama metala i biomarkera između postaja, koristila sam test analize kovarijance (ANCOVA), s dužinom kao kovarijablom. Za izračun korelacije između biometrijskih pokazatelja, koncentracija metala i biomarkera koristila sam Pearsonovu korelacijsku analizu, kao statistički test koji se koristi za utvrđivanje stupnja i načina povezanosti među varijablama. U svim testovima, statistički značajnima smatrane su vrijednosti na razini $p < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Biometrijski pokazatelji uzorkovanih organizama

U Tablici 1. prikazane su srednje vrijednosti biometrijskih pokazatelja te njihov raspon od minimuma do maksimuma (min-max). Standardna dužina, ukupna masa te masa gonada značajno su se razlikovale između postaja te su na postaji DRT pokazivale više vrijednosti. Vrijednosti kondicijskog (FCI) i gonadosomatskog indeksa (GSI) bile su nešto više na postaji REF, međutim razlika nije bila statistički značajna. Na navedenim postajama vidljiva je razlika u omjeru jedinki određenog spola te su na obje postaje najbrojnije jedinke muškog spola (Tablica 1).

Tablica 1. Biometrijski pokazatelji i indeksi kod štika na postajama REF i DRT. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija ($n = 16$), rasponi od minimuma do maksimuma (u zagradi) i razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema t-testu za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u biometrijskim pokazateljima između postaja označene su crvenom bojom. (FCI – Fultonov kondicijski indeks, GSI – gonadosomatski indeks, M - muški spol, F – ženski spol, N – spol nije određen).

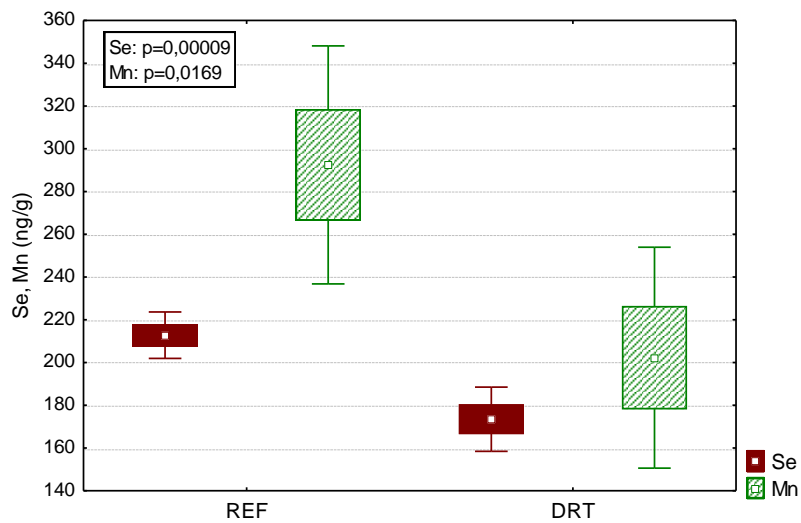
		REF	DRT	p
Standardna dužina		22,50 \pm 3,56 (16,50 - 31,50)	30,16 \pm 7,19 (15,00 - 41,50)	0,0010
Ukupna masa		120,06 \pm 65,91 (50,00 - 325,00)	395,88 \pm 174,59 (30,00 - 610,00)	0,0005
Masa gonada		0,61 \pm 0,29 (0,20 - 1,30)	1,16 \pm 0,85 (0,20 - 3,70)	0,0001
FCI (%)		0,99 \pm 0,14 (0,76 - 1,35)	0,92 \pm 0,09 (0,75 - 1,06)	0,1059
GSI (%)		0,57 \pm 0,26 (0,24-1,00)	0,42 \pm 0,27 (0,16 - 1,17)	0,9362
Spol	M	12	9	
	F	2	6	
	N	2	1	

3.2. Ukupne koncentracije odabranih metala i metaloida u mišiću štuke

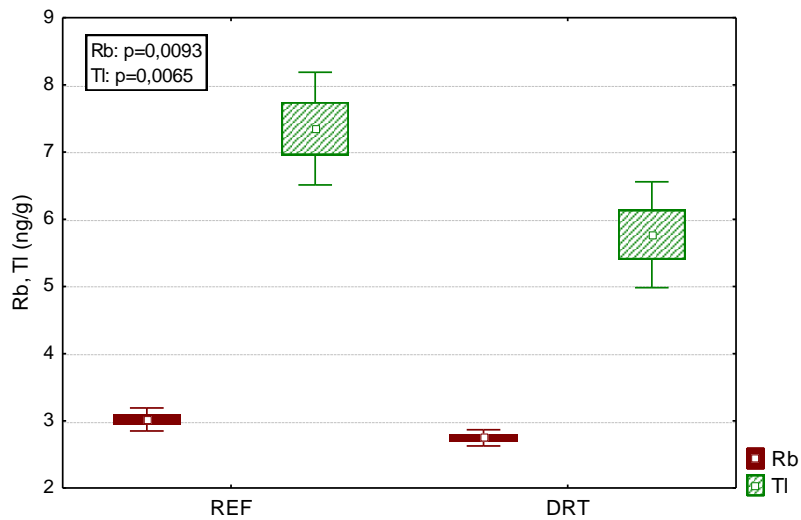
U Tablici 2 prikazane su od nižih prema višima ukupne koncentracije 16 metala i metaloida iz mišića štuka. Koncentracije Cd, Pb, Ag, Ni i Cr bile su ispod granice detekcije primijenjene metode (LOD). Rubidij, Mn, Se i Tl pokazuju statistički značajnu razliku u koncentracijama na dvije postaje, sa značajno višim vrijednostima na REF postaji (Tablica 2 i Slika 12 i 13).

Tablica 2. Srednje vrijednosti promatranih metala i metaloida u mišiću štuke \pm standardna devijacija (n=16), rasponi od minimuma do maksimuma (u zagradi) te razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema t-testu za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u koncentracijama metala označene su crvenom bojom.

Element (ng/g tkiva)	REF	DRT	p
Ag	< 0.014		
Cd	< 0.079		
Cr	< 0.139		
Ni	< 1.693		
Pb	< 1.703		
Co	1.881 \pm 0.489 (1.077 - 2.893)	1.696 \pm 0.574 (0.965 - 2.570)	0.3343
Bi	6.084 \pm 4.526 (1.115 - 18.509)	7.108 \pm 3.914 (1.553 - 15.111)	0.4988
Cs	6.229 \pm 0.913 (4.969 - 8.648)	6.483 \pm 0.872 (5.359 - 8.137)	0.4283
Tl	7.350 \pm 1.575 (5.060 - 11.347)	5.770 \pm 1.479 (3.781 - 8.361)	0.0065
As	17.892 \pm 5.371 (11.862 - 33.373)	20.094 \pm 6.244 (12.763 - 35.558)	0.1517
Cu	131.642 \pm 20.254 (101.541 - 168.837)	125.982 \pm 34.961 (91.678 - 227.248)	0.5794
Se	212.774 \pm 20.410 (176.940 - 251.137)	173.471 \pm 28.178 (108.352 - 224.151)	0.00009
Mn	292.443 \pm 104.503 (145.206 - 534.617)	202.259 \pm 96.983 (115.730 - 466.171)	0.0169
Fe	1117.906 \pm 242.332 (853.922 - 1797.810)	1027.818 \pm 316.737 (674.269 - 1865.878)	0.3734
Rb	3019.981 \pm 321.501 (2431.292 - 3590.659)	2746.850 \pm 225.906 (2393.502 - 3139.146)	0.009
Zn	3656.778 \pm 570.407 (2918.377 - 5082.638)	3428.985 \pm 792.930 (2241.477 - 5285.185)	0.326

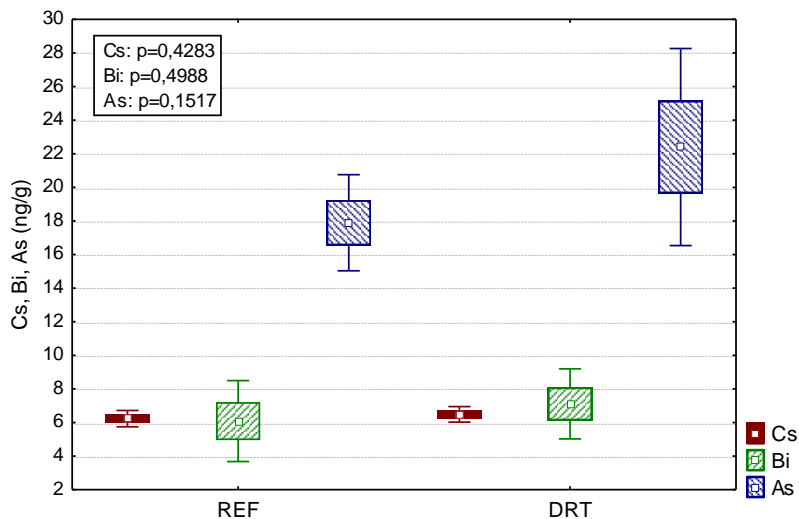


Slika 12. Koncentracije Se i Mn na postajama REF i DRT. Razine statističke značajnosti (p vrijednosti) prema t-testu za nezavisne uzorke, naznačene su u okviru na slici.



Slika 13. Koncentracije Rb i Tl na postajama REF i DRT. Razine statističke značajnosti (p vrijednosti) prema t-testu za nezavisne uzorke, naznačene su u okviru na slici.

Na REF postaji zabilježene su također više koncentracije Cu, Zn, Fe i Co nego na DRT postaji, no razlike nisu statistički značajne. Koncentracije As, Cs i Bi bile su više na DRT postaji, međutim nije ustanovljena statistički značajna razlika između postaja (Slika 14).

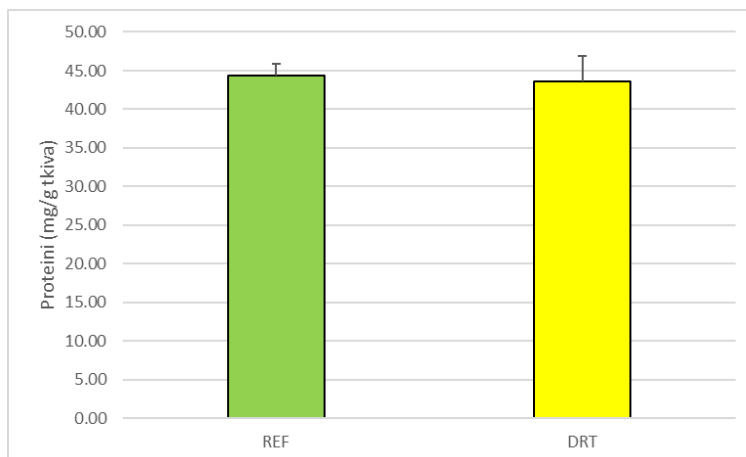


Slika 14. Koncentracije Cs, Bi i As u mišiću štuke na postajama REF i DRT. Razine statističke značajnosti (p vrijednosti) prema t-testu za nezavisne uzorke, naznačene su u okviru na slici.

3.3. Razine molekularnih biomarkera u mišiću štuke

3.3.1. Koncentracija proteina

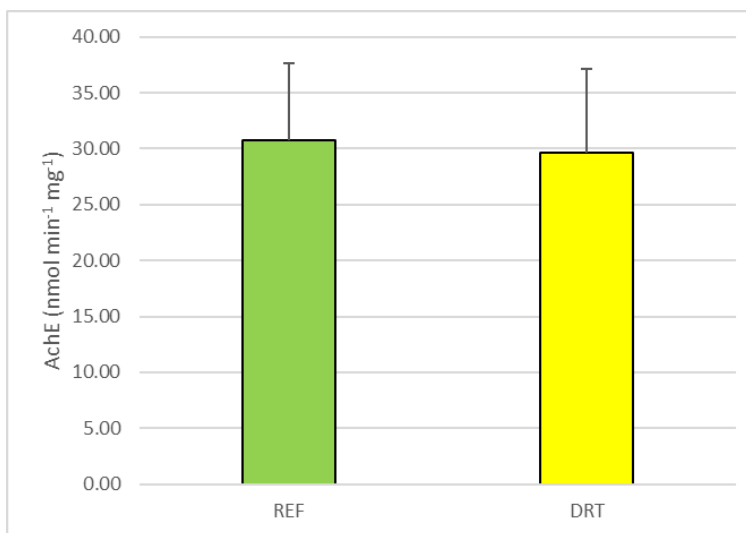
Koncentracije proteina u S10 frakciji mišića štuka na postajama REF i DRT prikazane su na Slici 15. Srednje vrijednosti koncentracija proteina na postaji REF iznosile su 44,3 mg/g tkiva i bile su nešto više nego na DRT postaji (43,6 mg/g), no razlika između postaja nije bila statistički značajna.



Slika 15. Koncentracija proteina u staničnoj S10 frakciji mišića štuke na postajama REF i DRT.

3.3.2. Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE)

Na Slici 16 prikazana je aktivnost enzima AChE u mišićima štuke na postajama REF i DRT izražena u $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina. Kao što se može vidjeti na Slici 16, aktivnost AChE bila je podjednaka na obje postaje te nije ustanovljena značajna razlika između postaja.

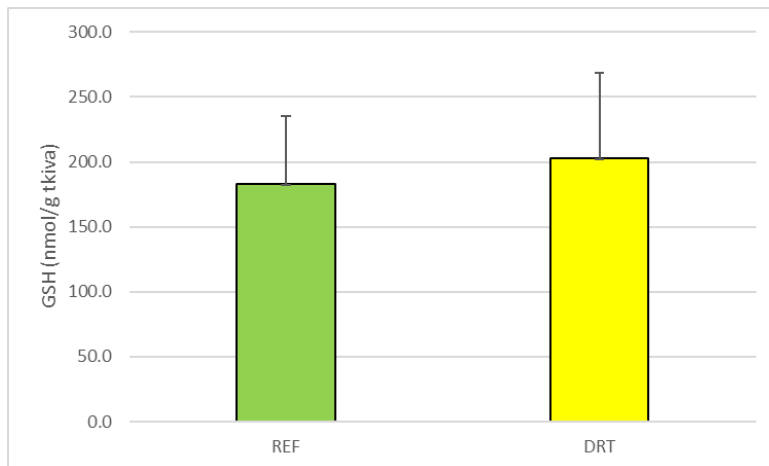


Slika 16. Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u mišiću štuke izražena u $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina na postajama REF i DRT.

Srednja vrijednost AchE na REF postaji iznosi 30,73, a na DRT 29,69 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina. Na REF postaji raspon vrijednosti iznosi 20,54 – 40,70 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina, dok je na DRT postaji bio 18,12 - 44,04 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.3.3. Koncentracija glutationa (GSH)

Na Slici 17 prikazane su srednje vrijednosti koncentracija GSH s pripadajućim standardnim devijacijama u mišiću štuke na postajama REF i DRT. Prosječna razina GSH na postaji DRT (208 nmol/g tkiva) bila je viša u odnosu na REF postaju (183 nmol/g tkiva), međutim razlika nije bila statistički značajna.

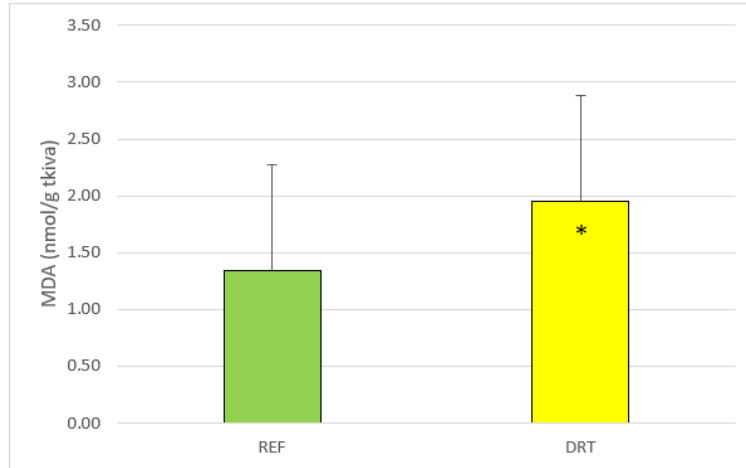


Slika 17. Koncentracija glutationa (GSH) u mišiću štuke na postajama REF i DRT.

3.3.4. Koncentracija malondialdehida (MDA)

Koncentracija MDA u mišiću štuke na postajama REF i DRT izražena je u nmol/g tkiva te je prikazana na Slici 18.

Na postaji DRT koncentracija MDA je viša (1,95 nmol/g tkiva) u odnosu na postaju REF (1,34 nmol/g tkiva) te je ustanovljena statistički značajna razlika u koncentracijama MDA između postaja.



Slika 18. Koncentracija malondialdehida (MDA) u mišiću štuke na postajama REF i DRT. Znak (*) unutar stupca DRT označava značajnu razliku između postaja ($p < 0.05$, t-test za nezavisne uzorke).

3.4. Korelacijska analiza

Kako bi se utvrdila međusobna ovisnost mjerenih metala i biomarkera u mišićima te biometrijskih pokazatelja štuka provedena je Pearsonova korelacijska analiza. Dobiveni korelacijski koeficijenti (Pearsonov r) prikazani su u Tablici 3 za postaju REF te u Tablici 4 za postaju DRT.

Kao što se može vidjeti u Tablicama 3 i 4, na objema postajama dužina i masa štuka pokazuju međusobno visoku pozitivnu korelaciju ($r > 0,9$).

Na obje postaje također se uočava povezanost biometrijskih pokazatelja dužine i/ili mase s koncentracijama metala. Za većinu elemenata radi se o negativnoj korelaciji, dok koncentracija Bi pokazuje pozitivnu korelaciju s dužinom jedinke na obje postaje, statistički značajno na REF postaji. Koncentracije Rb na postaji REF također su pokazale statistički značajnu pozitivnu korelaciju s dužinom jedinke. Arsen i Co su elementi čije koncentracije na obje postaje statistički značajno negativno koreliraju s dužinom jedinke, dok koncentracije Fe značajno negativno koreliraju s dužinom jedinke na REF postaji, a Mn na DRT postaji.

Metali također međusobno koreliraju, a od statistički značajnih pozitivnih korelacija izdvajaju se korelacije između Rb i Cs te Zn i As, koje su ustanovljene na objema postajama.

Što se tiče korelacije mjerenih biomarkera s dužinom jedinke, na REF postaji koncentracija GSH pokazuje statistički značajnu pozitivnu korelaciju (Tablica 3), dok je na DRT postaji ustanovljena negativna korelacija (Tablica 4). Ustanovljena je također negativna korelacija koncentracije AchE i proteina s dužinom jedinke na obje postaje, no statistički značajno samo na REF postaji. Gonadosomatski indeks je negativno korelirao s razinom GSH na postaji REF.

Što se tiče povezanosti metala i biomarkera, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija AchE s Zn, i Co na obje postaje, s Cu na REF postaji te s Mn na postaji DRT.

Tablica 3. Pearsonovi korelacijski koeficijenti (r) za biometrijske pokazatelje (dužina i masa štuca) i indekse (FCI – Fultonov kondicijski indeks i GSI – gonadosomatski indeks), mjerene metale i metalloide te biomarkere (TP - proteini, AchE - acetilkolinesteraza, GSH - glutation i MDA malondialdehid) na REF postaji. Statistički značajni r ($p < 0,05$) označeni su crvenom bojom.

	Dužina	Masa	FCI	GSI	Se	Rb	Cs	Tl	Bi	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	AchE	MDA	TP	GSH
Dužina																			
Masa	0.937																		
FCI	-0.162	0.124																	
GSI	-0.415	-0.461	-0.283																
Se	0.170	0.205	0.001	0.246															
Rb	0.020	0.137	0.236	0.582	0.224														
Cs	0.095	0.042	-0.007	0.433	-0.168	0.587													
Tl	-0.059	0.131	0.409	0.079	0.159	0.409	0.122												
Bi	0.631	0.614	-0.072	0.109	0.402	0.411	0.440	0.512											
Mn	0.123	0.049	-0.344	-0.375	0.134	-0.558	-0.499	-0.096	-0.093										
Fe	-0.569	-0.402	0.513	0.320	0.172	0.157	0.220	0.325	-0.083	-0.091									
Co	-0.685	-0.566	0.318	0.347	0.336	0.079	-0.191	0.394	-0.190	-0.023	0.612								
Cu	-0.346	-0.195	0.283	0.211	0.353	-0.015	-0.122	0.068	-0.089	0.015	0.654	0.471							
Zn	-0.309	-0.466	-0.539	0.132	-0.062	-0.608	-0.465	-0.304	-0.405	0.452	-0.009	0.173	0.197						
As	-0.528	-0.514	-0.164	0.316	-0.048	-0.118	-0.281	0.009	-0.385	0.307	0.349	0.508	0.245	0.614					
AchE	-0.593	-0.614	-0.141	0.222	0.031	-0.365	-0.297	0.035	-0.339	0.361	0.390	0.578	0.567	0.593	0.442				
MDA	-0.309	-0.319	0.100	0.115	0.007	0.053	0.269	-0.224	-0.148	-0.327	0.214	0.273	-0.021	-0.355	-0.074	-0.113			
TP	-0.521	-0.575	0.113	0.387	-0.041	0.189	0.136	-0.331	-0.395	-0.559	0.162	0.219	-0.018	-0.011	0.139	-0.001	0.431		
GSH	0.514	0.491	0.096	-0.638	-0.356	-0.288	-0.053	-0.415	-0.192	0.112	-0.357	-0.499	-0.348	-0.033	-0.100	-0.414	-0.201	-0.173	

Tablica 4. Pearsonovi korelacijski koeficijenti (r) za biometrijske pokazatelje (dužina i masa štika) i indekse (FCI – Fultonov kondicijski indeks i GSI – gonadosomatski indeks), mjerene metale i metalloide te biomarkere (TP - proteini, AchE - acetilkolinesteraza, GSH - glutation i MDA - malondialdehid) na DRT postaji. Statistički značajni r (p < 0,05) označeni su crvenom bojom.

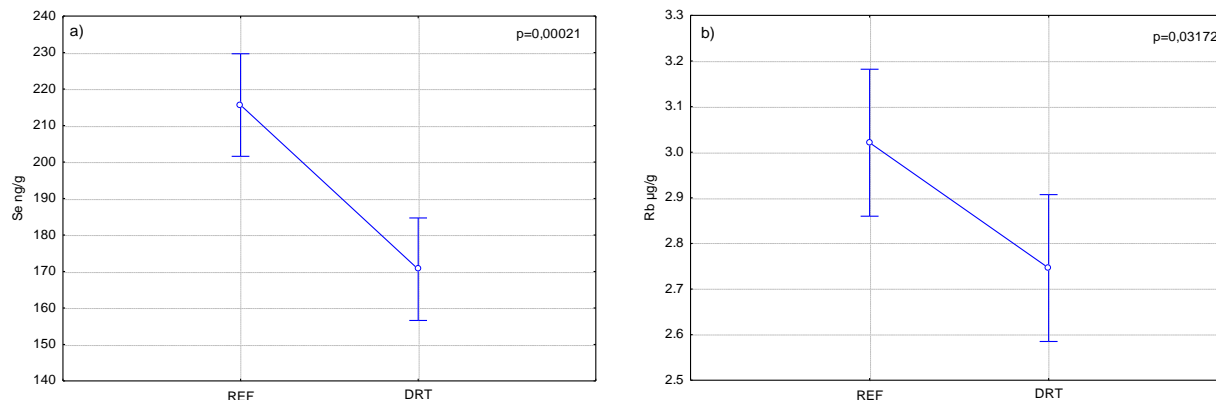
	Dužina	Masa	FCI	GSI	Se	Rb	Cs	Tl	Bi	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	AchE	TP	GSH	MDA
Dužina																			
Masa	0.958																		
FCI	0.315	0.407																	
GSI	-0.439	-0.359	-0.650																
Se	0.176	0.208	0.070	0.137															
Rb	-0.005	0.176	0.194	0.345	0.356														
Cs	0.013	0.067	-0.005	0.139	0.022	0.627													
Tl	-0.420	-0.252	-0.066	0.618	0.023	0.788	0.492												
Bi	0.457	0.282	-0.124	-0.368	-0.070	-0.189	0.314	-0.460											
Mn	-0.539	-0.456	-0.501	0.656	0.299	0.370	0.025	0.619	-0.302										
Fe	-0.178	-0.162	-0.107	0.066	0.148	0.113	-0.060	0.063	-0.201	0.193									
Co	-0.510	-0.398	-0.154	0.500	0.395	0.433	-0.071	0.616	-0.681	0.663	0.440								
Cu	0.004	0.096	0.196	0.174	0.216	0.164	-0.120	0.163	-0.351	0.143	0.009	0.355							
Zn	-0.300	-0.167	-0.458	0.667	0.419	0.367	-0.111	0.458	-0.474	0.793	0.335	0.676	0.407						
As	-0.683	-0.615	-0.405	0.737	0.042	0.144	0.004	0.468	-0.483	0.624	0.047	0.468	0.281	0.572					
AchE	-0.413	-0.323	-0.447	0.488	0.473	0.214	0.008	0.282	-0.212	0.736	0.288	0.519	0.222	0.688	0.497				
TP	-0.241	-0.208	0.129	-0.537	0.049	-0.037	-0.249	0.013	-0.461	-0.013	0.187	0.119	-0.307	-0.084	0.230	0.074			
GSH	-0.179	-0.223	0.073	0.113	-0.537	-0.222	-0.154	0.063	-0.308	-0.365	-0.353	0.080	0.364	-0.196	0.238	-0.461	-0.028		
MDA	-0.011	-0.078	0.292	-0.336	0.245	0.020	0.247	-0.213	0.256	-0.211	0.458	-0.054	-0.427	-0.384	-0.256	-0.077	0.181	-0.599	

3.5. Utjecaj veličine jedinki na koncentracije metala i biomarkera

Prethodno provedenim statističkim analizama potvrđene su značajne razlike u biometriji riba između promatranih postaja (Tablica 1), kao i značajna povezanost biometrije s pojedinim metalima i biomarkerima (Tablice 3 i 4).

Kako bismo odredili doprinos razlike u biometriji riba između dviju postaja (Tablica 1) na mjerene parametre, odnosno kako bi utvrdili jesu li dobivene razlike njihovih vrijednosti između postaja samo posljedica različite veličine riba, proveli smo analizu kovarijance (ANCOVA) s dužinom kao kovarijablom. Ovom statističkom analizom eliminirali smo utjecaj veličine riba na mjerene biomarkere i metale.

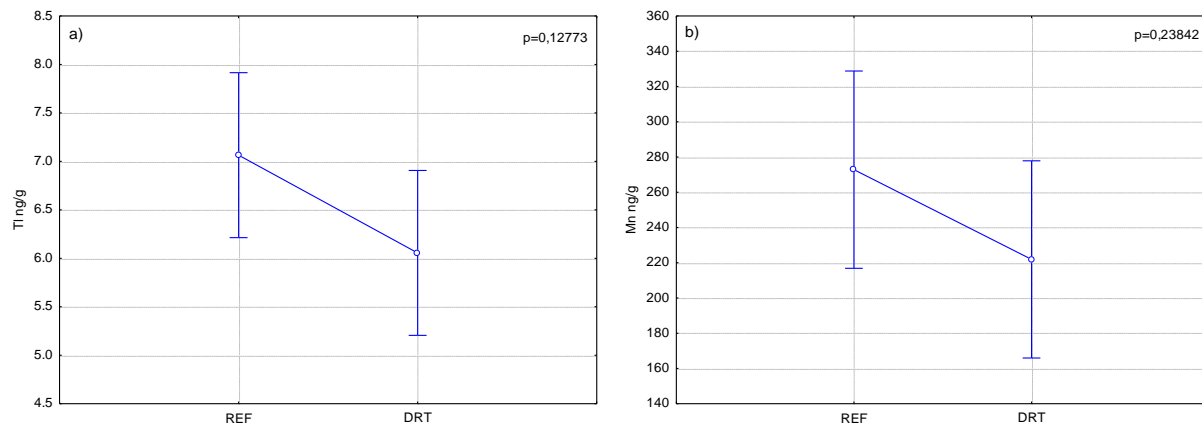
Elementi Se i Rb pokazali su statistički značajne razlike između postaja (Slike 12 i 13). Usporedbom korigiranih vrijednosti na dužinu jedinki, potvrđena je statistički značajna razlika između postaja za ova dva elementa (Slika 19a i b), što znači da ustanovljena razlika između postaja nije uvjetovana doprinosom biometrije, odnosno razlikama u veličinama riba na REF i DRT postaji.



Slika 19. Korigirane srednje vrijednosti Se (a) i Rb (b) na dužinu na postajama REF i DRT. Na slikama je naznačena razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema ANCOVA testu.

Vertikalne linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.

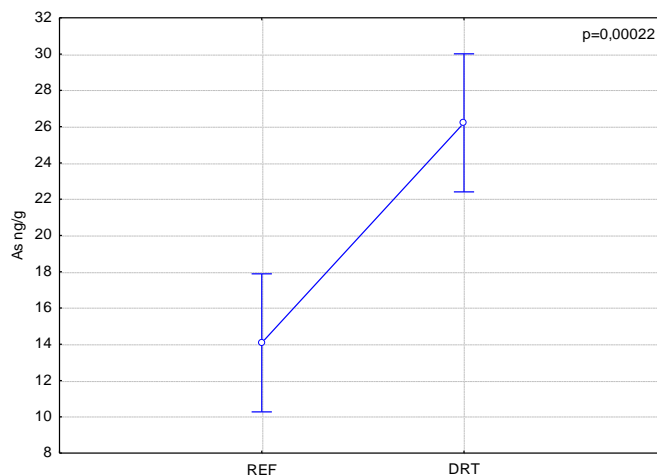
Nekorigirane vrijednosti koncentracija Tl i Mn pokazale su statistički značajne razlike između postaja (Slike 12 i 13). Usporedbom korigiranih vrijednosti Tl (Slika 20a) i Mn na dužinu (Slika 20b) ustanovljeno je da zapravo ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama ovih elemenata između postaja te da je ona u nekorigiranih vrijednosti proizlazila iz razlike u veličini riba na ove dvije postaje (Slika 20a i b).



Slika 20. Korigirane srednje vrijednosti Tl (a) i Mn (b) na dužinu na postajama REF i DRT. Na slikama je naznačena razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema ANCOVA testu.

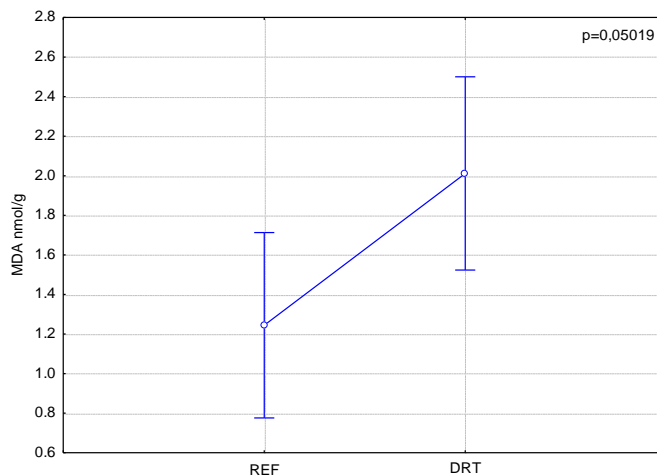
Vertikalne linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.

Nekorigirane vrijednosti koncentracija As nisu se značajno razlikovale između postaja (Slika 14). Usporedbom korigiranih vrijednosti As na dužinu (Slika 21), odnosno uklanjanjem doprinosa biometrije, ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentracijama As na dvjema postajama.



Slika 21. Korigirane srednje vrijednosti As na dužinu na postajama REF i DRT. Na slici je naznačena razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema ANCOVA testu. Vertikalne linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.

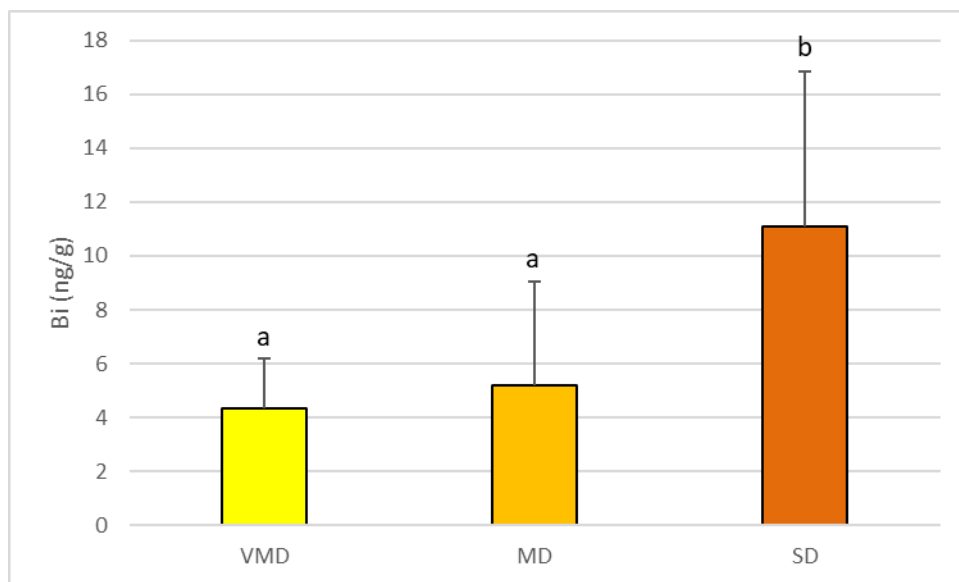
Za nekorrigirane vrijednosti MDA ustanovljena je statistički značajna razlika između postaja (Slika 18). Usporedbom korigiranih vrijednosti na dužinu jedinki, razina statističke značajnosti nešto se smanjila što ukazuje na određeni doprinos veličine riba na utvrđene razlike u koncentracijama MDA između ovih dviju postaja (Slika 22).



Slika 22. Korigirane srednje vrijednosti MDA na dužinu na postajama REF i DRT. Na slici je naznačena razina statističke značajnosti (p vrijednost) prema ANCOVA testu. Vertikalne linije označavaju 95%-tni interval pouzdanosti.

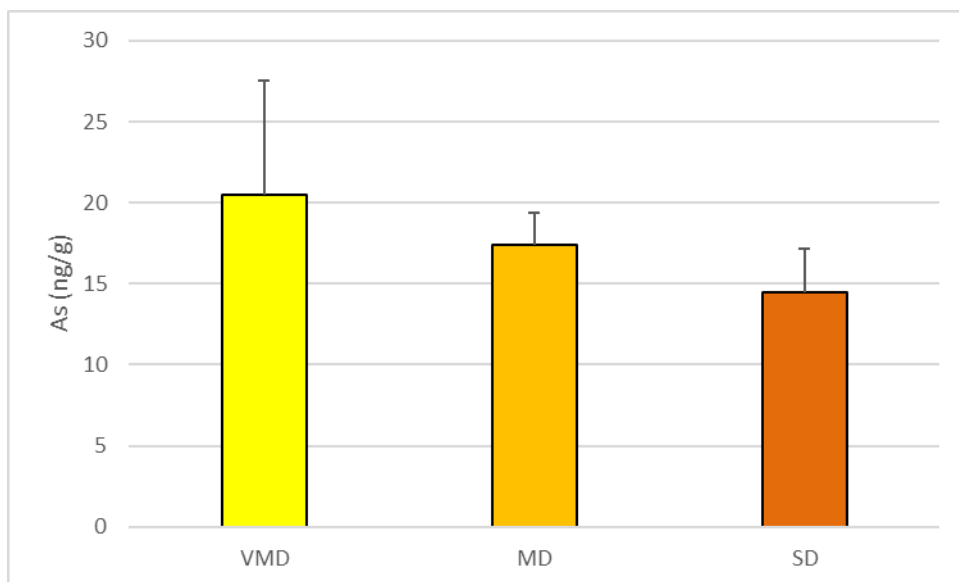
Kako bismo dodatno istražili utjecaj dužine, odnosno starosti riba na koncentracije metala i biomarkera, promatrali smo njihove promjene s obzirom na rast jedinki, za svaku postaju zasebno. Za tu svrhu, ribe su grupirane u nekoliko kategorija s obzirom na njihovu dužinu i masu. Kako su se rasponi dužina i masa uzorkovanih jedinki značajno razlikovali na REF i DRT postaji, nije bilo moguće napraviti jednake kategorije veličina za obje postaje, već su za svaku postaju kategorije definirane odvojeno. Na REF postaji definirane su tri veličinske kategorije: 1) VMD kategorija (vrlo male dužine; 16,5 – 22 cm i 50 - 100 g), 2) MD kategorija (male dužine; 22,5 – 23,5 cm i 105 - 130 g) i 3) i SD kategorija (srednje dužine; 24 – 31,5 cm i 170 – 325 g). Na DRT postaji ribe su grupirane u četiri veličinske kategorije: 1) VMD kategorija (vrlo male dužine; 15 – 23 cm i 30 - 96 g), 2) SD1 kategorija (srednje dužine; 29 – 31,5 cm i 250 – 285 g) i 3), SD2 kategorija (srednje dužine; 32,5 – 33 cm i 310 – 380 g) i 4) VD kategorija (velike dužine; 34 – 41,5 cm i 365 - 610 g).

Pearsonovom korelacijskom analizom provedenom na svim podacima za REF postaju, ustanovljena je statistički značajna pozitivna korelacija dužine jedinki s koncentracijama Bi u mišiću (Tablica 3), što upućuje na zaključak da rast jedinki prati porast koncentracija Bi u mišiću. Dodatnom usporedbom pojedinih veličinskih kategorija ustanovljeno je da se na REF postaji jedinke SD po koncentraciji Bi statistički značajno razlikuju od jedinki MD i VMD, dok se jedinke VMD i MD ne razlikuju međusobno statistički značajno, što je prikazano na Slici 23.



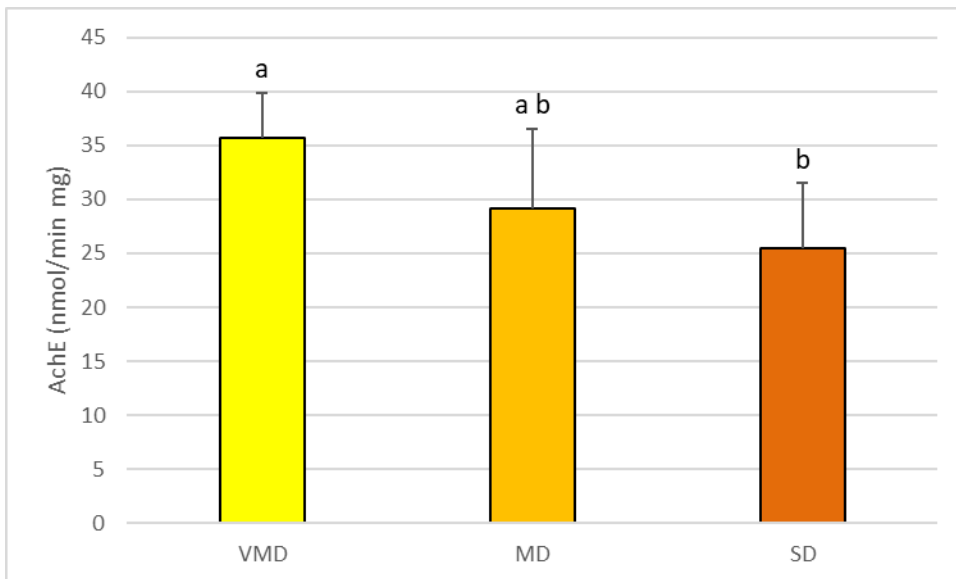
Slika 23. Koncentracija Bi u različitim veličinskim kategorijama štika na REF postaji (VMD – vrlo male dužine, MD – male dužine, SD – srednje dužine). Značajne razlike između kategorija označene su različitim slovima iznad stupaca ($p < 0,05$; LSD *post hoc* test).

Za As je na REF postaji Pearsonovom korelacijskom analizom provedenom na svim podacima ustanovljena statistički značajna negativna korelacija dužine jedinki s koncentracijama As u mišiću (Tablica 3). Iz Slike 24, koja prikazuje koncentracije As u trima veličinskim kategorijama štika na REF postaji, također se uočava trend pada prosječnih koncentracija As s porastom veličine jedinki, mada razlika između kategorija nije bila značajna.



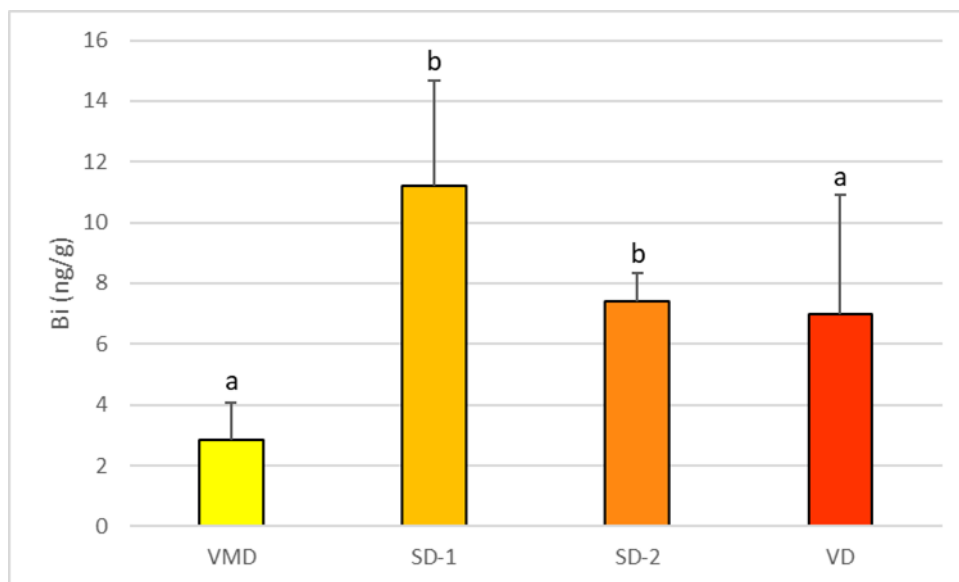
Slika 24. Koncentracija As u različitim veličinskim kategorijama štuka na REF postaji (VMD – vrlo male dužine, MD – male dužine, SD – srednje dužine).

S obzirom na različite kategorije veličina, na REF postaji se prema aktivnosti enzima AchE, jedinke VMD razlikuju od jedinki MD i SD, ali je razlika statistički značajna samo u usporedbi s jedinkama SD. Jedinke MD ne razlikuju se značajno od jedinki VMD i SD (Slika 25).



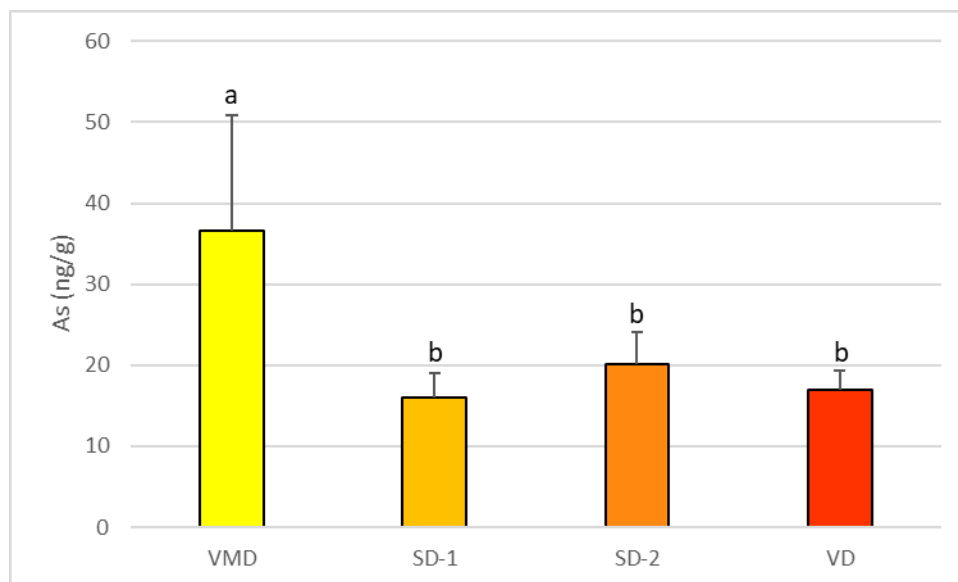
Slika 25. Aktivnost enzima AchE u različitim veličinskim kategorijama štika na REF postaji (VMD – vrlo male dužine, MD – male dužine, SD – srednje dužine). Značajne razlike između kategorija označene su različitim slovima iznad stupaca ($p < 0,05$; LSD *post hoc* test).

Na postaji DRT, ANOVA-om su ustanovljene statistički značajne razlike između različitih kategorija veličina za elemente Bi i As. Iz Slike 26, može se uočiti statistički značajan porast koncentracija Bi u svim veličinskim kategorijama u odnosu na VMD kategoriju. Također se može vidjeti da ne postoji jasan trend promjena u koncentracijama Bi u kategorijama štika srednjih i velikih dužina.



Slika 26. Koncentracija Bi u različitim veličinskim kategorijama štika na DRT postaji (VMD – vrlo male dužine, MD – male dužine, SD – srednje dužine, VD – velike dužine). Značajne razlike između kategorija označene su različitim slovima iznad stupaca ($p < 0,05$; LSD *post hoc* test).

Na usporednom prikazu raspodjele koncentracija As u različitim kategorijama veličina na postaji DRT (Slika 27), uočavaju se značajno veće koncentracije As u štika vrlo male dužine (VMD) u odnosu na štuke iz kategorija srednjih i velikih dužina, kao i približno podjednake koncentracije As u jedinki iz kategorija srednjih i velikih dužina.

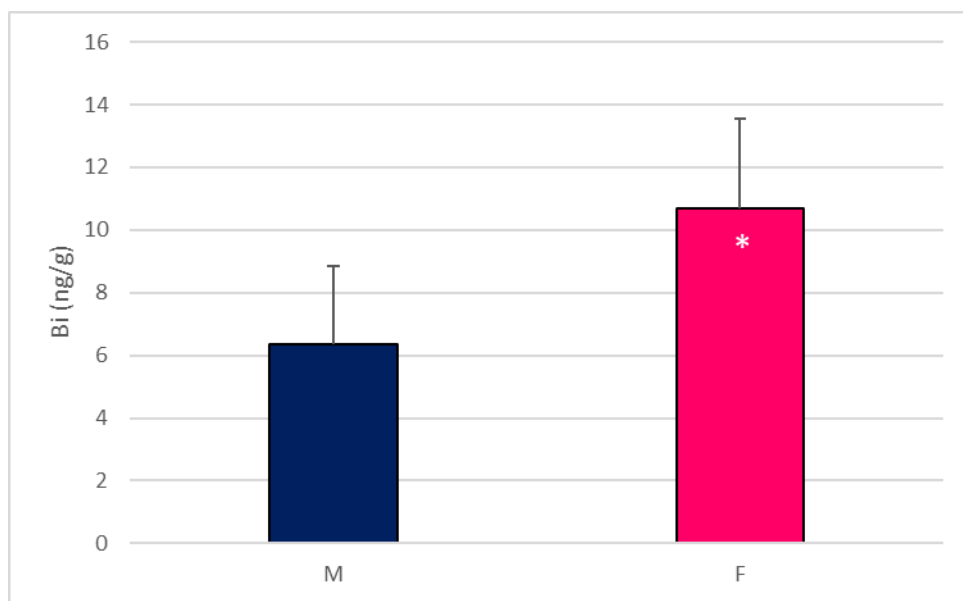


Slika 27. Koncentracija As u različitim veličinskim kategorijama štuca na DRT postaji (VMD – vrlo male dužine, MD – male dužine, SD – srednje dužine, VD – velike dužine). Značajne razlike između kategorija označene su različitim slovima iznad stupaca ($p < 0,05$; LSD *post hoc* test).

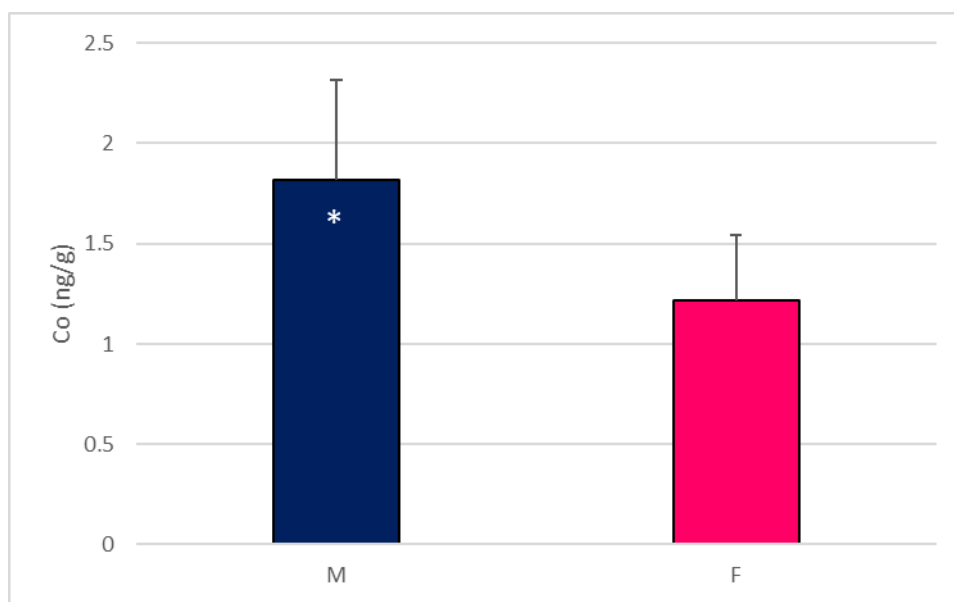
3.6. Utjecaj spola na koncentracije metala i biomarkera

Moguća je povezanost koncentracije određenog metala sa spolom jedinke, no pri donošenju zaključaka treba obratiti pozornost na dob i masu jedinke. S obzirom da je na REF postaji uzorkovan relativno mali broj jedinki ženskog spola, procjenu utjecaja spola na koncentracije metala bilo je moguće provesti samo na štukama s DRT postaje. U statističku analizu nisu uključene jedinke VMD, jer u toj veličinskoj kategoriji na ovoj postaji nisu bile zastupljene jedinke ženskog spola.

Kao što se može vidjeti na Slici 28, jedinke ženskog spola imaju statistički značajno više koncentracije Bi od jedinki muškog spola (Slika 28). Za razliku od Bi, koncentracije Co značajno su više u jedinki muškog spola (Slika 29). Jedinke ženskog spola imaju u prosjeku više koncentracije Cs, Mn i As od jedinki muškog spola, no nije ustanovljena statistička značajnost.



Slika 28. Koncentracija Bi ovisno o spolu jedinke (M – muški spol, F – ženski spol). Znak (*) unutar stupca F označava značajnu razliku između spolova ($p < 0.05$, t-test za nezavisne uzorke).



Slika 29. Koncentracija Co ovisno o spolu jedinke (M – muški spol, F – ženski spol). Znak (*) unutar stupca M označava značajnu razliku između spolova ($p < 0.05$, t-test za nezavisne uzorke).

4. RASPRAVA

Antropogene aktivnosti poput prometa, rudarenja, odlaganja otpada i industrije dovode do zagađenja vodenih ekosustava štetnim tvarima, među kojima se izdvajaju metali (Gupta i Singh 2011). Ribe reagiraju na fizikalne i kemijske uvjete koji vladaju u vodi te se iz tog razloga smatraju pogodnim bioindikatorima. Njihov dug životni vijek također im daje na važnosti u istraživanjima zagađenja vodenih ekosustava (URL 8).

Glavni ciljevi ovog rada bili su procijeniti izloženost kao i moguće štetne posljedice povećane izloženosti metalima u štuke (*E. lucius*), kao reprezentativnog bioindikatorskog organizma u rijeci Mrežnici, na mjestu dugogodišnje kontaminacije ove rijeke otpadnim vodama pamučne industrije u Dugoj Resi. Analiza bioakumulacije metala i procjena bioloških učinaka provedena je na mišiću štuke, kao ciljnom bioindikatorskom organu.

Rezultati analize sadržaja metala ukazali su na relativno mali utjecaj dugogodišnje kontaminacije rijeke na akumuliranu količinu metala u mišiću štuka. Od analiziranih elemenata, jedino su koncentracije As, Cs i Bi bile više na postaji na mjestu nekadašnje tekstilne tvornice (postaja DRT), s tim da povišenje nije bilo statistički značajno, a za četiri elementa (Rb, Mn, Se i Tl) ustanovljene su statistički značajno više koncentracije na postaji bez značajnijeg antropogenog utjecaja (postaja REF). Esencijalni elementi Cu, Zn, Fe i Co također su pokazali više koncentracije na REF postaji. Nadalje, koncentracije ekotoksičnih elemenata Cd, Ag, Ni, Cr i Pb, bile su ispod granice detekcije metode na obje postaje, što može ukazivati ili na nisku izloženost u ovom dijelu vodotoka rijeke Mrežnice i/ili na općenito nisku stopu akumulacije ovih elemenata u mišiću štuke.

Analiza sadržaja metala u vodi i sedimentima na postajama REF i DRT, provedena u više navrata tijekom 2020. i 2021. godine, ukazala je na općenito nisku razinu onečišćenja metalima, ali i na relativno male razlike u koncentracijama metala između ovih dviju postaja (Dragun i sur. 2022). Među važnijim razlikama između postaja, autori su istaknuli nešto više koncentracije Cd i Tl u vodi na REF postaji, vjerojatno kao rezultat prirodnog sastava sedimenta ili poljoprivrednih aktivnosti u blizini ovog dijela rijeke te Cu, Co i Fe u vodi na DRT postaji. Što se tiče povezanosti koncentracija metala u mišićima, dobivenim u ovom istraživanju, s njihovim koncentracijama u vodi (Dragun i sur. 2022), jedino se za koncentracije Tl u mišiću može reći da su pratile trend koncentracija u vodi. Više koncentracije Cd u sedimentu na REF postaji nisu rezultirale značajnim

povećanjem Cd u mišiću štuka s ove postaje, dok su koncentracije Mn bile značajno više i u sedimentu i u mišiću štuka s ove postaje. Nešto više vrijednosti Co, Cr, Cu, Fe i Pb u sedimentima s DRT postaje nisu praćene povećanjem akumulacije ovih elemenata u mišiću, a jedino je Cs pokazivao više vrijednosti i u sedimentu i u mišiću štuka na DRT postaji.

U radu Mohanty i Samante (2016) proučavana je povezanost koncentracije metala u mišićima s antropogenim zagađenjem. Kao pokusni organizam korištena je vrsta *Notopterus notopterus* (Pallas, 1769), a istraživanje je provedeno u rijeci Mahanadi na području Indije. Uzorkovanje je provedeno na tri lokacije, prva lokacija bila je bez antropogenog utjecaja, dok su ostale dvije lokacije predstavljale mjesta sa značajnim utjecajem industrije čelika, kroma i željeznih legura. Najviše koncentracije željeza u mišiću ribe *N. notopterus* zabilježene su na lokaciji broj 2 s antropogenim djelovanjem dok su na lokaciji bez antropogenog utjecaja te na lokaciji broj 3 s antropogenim djelovanjem vrijednosti bile znatno niže. Bitno je napomenuti da je na lokaciji broj 3 zabilježena viša koncentracija željeza nego na lokaciji broj 1 na kojoj nije prisutan antropogeni utjecaj (Mohanty i Samanta 2016). Iz toga se može zaključiti kako koncentracija željeza ne ovisi u potpunosti o prisutnosti zagađivala jer veličina, spol i starost jedinke isto tako određuju sposobnost bioakumulacije. Za razliku od željeza, Cu je na lokaciji 2 imao najniže vrijednosti, dok je na lokaciji 1 izmjerena viša koncentracija nego na lokaciji 3. Takva raspodjela koncentracija govori u prilog gore navedenom zaključku.

Na koncentracije metala također mogu utjecati veličina, starost te spol jedinke. U našem smo istraživanju testirali utjecaj veličine i spola jedinke na akumulaciju metala u mišićima štuke. Analizom kovarijance utvrđen je značajan utjecaj veličine (dužine) riba na utvrđene razlike u koncentracijama Tl, Mn i As između dviju postaja. U istraživanju od Has-Shon i suradnika (2015) navedeno je da se akumulacija metala povećava sa starošću ribe. U našem istraživanju jedinkama nije određena starost te smo testirali utjecaj dužine jedinke, što podrazumijeva i veću starost jedinke, na akumulaciju metala. Ustanovljen je značajan utjecaj dužine jedinke na akumulaciju Bi, Co i As, pri čemu Co i As pokazuju negativan trend s porastom dužine jedinke, a Bi pozitivan. U istraživanju je opažena povezanost spola i koncentracije metala te je tako kod ženskih jedinki zabilježena viša koncentracija Bi, dok je kod jedinki muškog spola više koncentracije imao Co. Za razliku od rezultata dobivenih našim istraživanjem, u radu Pintaeva i sur. (2011) zabilježene su više koncentracije Co kod jedinki ženskog spola. Navedena razlika u dobivenim rezultatima

moгуća je posljedica različite starosti jedinke, tj. postoji mogućnost da su jedinke muškog spola u našem istraživanju manje starosti od onih uzorkovanih za potrebe navedenog rada.

Arsen se u vodu oslobađa iz industrijskih postrojenja ili mu se koncentracija u vodi povećava korištenjem pesticida. Vodena biota uslijed stalnog izlaganja niskim koncentracijama arsena počinje bioakumulirati navedeni metal (Kumari i sur. 2017). Koncentracije As u mišiću vrste *Lota lota* (Linnaeus, 1758) negativno koreliraju sa starošću i veličinom ribe (Chételat i sur. 2019), što je u skladu s rezultatima dobivenim u našem istraživanju. Bitno je napomenuti da se u navedenom istraživanju radi o suhoj masi tkiva, pa je za očekivati nešto veće vrijednosti koncentracija u usporedbi s koncentracijama određenim u ovom radu, u kojem su koncentracije metala izražene po mokroj masi tkiva. U radu od Kelly i Janz (2009) opisano je istraživanje utjecaja otpadnih voda nastalih mljevenjem urana te su zabilježene znatno više koncentracije As u usporedbi s našim istraživanjem. U skladu s navedenim istraživanjem, koncentracije As zabilježene u našem istraživanju bile su također više na postaji s onečišćenjem, odnosno postaji DRT. Više vrijednosti u istraživanju Kelly i Janz (2009) moguća su posljedica onečišćenja uranom uz koji se oslobađaju ostali toksični elementi i spojevi. Isti autori na referentnom lokalitetu zabilježili su višu koncentraciju Bi, dok su u našem istraživanju više koncentracije zabilježene na DRT postaji. Željezo, Cu i Tl su u navedenom radu višu koncentraciju pokazivali na onečišćenim lokalitetima, za razliku od naših rezultata. Koncentracije Zn zabilježene u našem istraživanju više su na REF postaji, što je u skladu s promatranim radom (Kelly i Janz 2009). Povećane koncentracije Co nađene su na mjestima pod utjecajem onečišćenja iz tekstilne industrije te na području rudnika ugljena (Diamond i sur. 1992). Iako su nešto više vrijednosti Co ustanovljene u sedimentima na postaji pod utjecajem nekadašnje tvornice tekstila (postaja DRT) (Dragun i sur. 2022), one se nisu odrazile u povećanoj akumulaciji ovog elementa u mišićima štuke. Kadmij i Pb metali su sa toksičnim djelovanjem, dok njihova korist za organizam nije poznata (Even i Ghaffari 2011). U našem istraživanju vrijednosti koncentracije navedenih metala bile su ispod granice detekcije na oba istraživana lokaliteta, što govori u prilog manjoj izloženost i/ili niskoj stopi bioakumulacije ovih elemenata u mišiću štuke. U skladu s našim rezultatima, u radu od Kenšová i sur. (2010) navedeno je da u pravilu nepredatorske vrste imaju više koncentracije Cd.

Pri normalnim koncentracijama Fe ne predstavlja opasnost za vodenu biotu, no ukoliko dođe do povećanja koncentracije ovog metala, Fe gubi sposobnost otapanja u vodi te dolazi do

bioakumulacije (URL 8). U našem istraživanju koncentracija Fe viša je na REF postaji, iako ne statistički značajno. Isti rezultat zabilježen je u istraživanju od Rajkowska i Protasowicki (2013) u kojem su uspoređene koncentracije Fe, Mn, Zn i Cu. Koncentracije Mn u navedenom radu na obje postaje su bile podjednake, dok su u našem istraživanju koncentracije mangana na REF postaji bile značajno više od onih izmjerenih na DRT. Cink je u našem istraživanju više koncentracije pokazivao na REF postaji, no razlika među postajama nije statistički značajna, što je u skladu s istraživanjem Rajkowska i Protasowicki (2013). Bitno je napomenuti da Zn u pravilu kod predatorskih vrsta pokazuje niže koncentracije (Kenšová i sur. 2010). Koncentracije Cu izmjerene u našem istraživanju nešto su više na REF postaji, no razlika nije statistički značajna. Za razliku od koncentracije Cu zabilježene u našem istraživanju, u radu Rajkowska i Protasowicki (2013), više koncentracije Cu izmjerene su na postaji s prisutnim industrijskim onečišćenjem.

Kelly i Janz (2009) u svom istraživanju navode kako vrijednosti GSH izmjerene u mišiću ribe nisu pokazivale statistički značajnu razliku između lokaliteta te su vrijednosti izmjerene u mišiću bile znatno niže od onih u bubregu i jetri. U radu Payne i sur. (1996) koncentracije AchE kod vrste *Pleuronectes americanus* (Walbaum, 1792) nisu su značajno razlikovale između referentne i postaje na kojoj je prisutno onečišćenje. Za razliku od navedene vrste, kod potočne pastrve zabilježena je značajna razlika među postajama (Payne i sur. 1996). Navedene rezultate moguće je protumačiti kao posljedicu različitog načina prehrane navedene dvije vrste riba. Vrsta *P. americanus* živi pri dnu i hrani se beskralježnjacima, a za razliku od nje, pastrva u slatkovodnim ekosustavima predstavlja grabežljivca (Stehlik i Meise 2000).

U našem istraživanju aktivnost AchE na DRT niža je nego na postaji REF, što odgovara pretpostavki da izloženost vodene biote onečišćujućim tvarima inhibira aktivnost AchE (Golombieski i sur. 2008). Takav rezultat dobiven je u istraživanju od Al-Ghais (2013), u kojem su uspoređene koncentracije AchE u čistoj vodi i vodi iz kanalizacije te je zabilježeno da AchE manju aktivnost pokazuje u onečišćenoj vodi. Za razliku od AchE, odredili smo da je prosječna koncentracija GSH viša na DRT postaji, što je u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju od Al-Ghais (2013) u kojem je koncentracija GSH bila također viša u onečišćenoj vodi. Koncentracije MDA više su na onečišćenim područjima, tj. mjestima na kojima je prisutan veći oksidativni stres (Karadag i Firat 2014). U skladu s navedenim, u našem je istraživanju viša koncentracija MDA zabilježena na DRT postaji.

Dosadašnjim istraživanjima dokazana je povezanost izloženosti As i smanjenja koncentracije GSH (Hall i sur. 2013). U našem istraživanju na REF postaji je zabilježena negativna korelacija As sa GSH, no nije bila statistički značajna, dok je na DRT postaji navedena korelacija bila pozitivna.

5. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem dobiven je uvid u koncentracije metala i metaloida u mišićima štuka uzorkovanim na dvije postaje na rijeci Mrežnici, referentnoj postaji (REF) bez onečišćenja te postaji Duga Resa tvornica (DRT) na mjestu nekadašnjeg postrojenja tekstilne industrije. Analizom biomarkerskih odgovora ustanovljena je korelacija s ostalim pokazateljima iz koje je moguće odrediti njihov međusobni utjecaj.

1. Analiza izmjerenih koncentracija metala ukazala je na općenito nisku razinu akumulacije toksičnih metala Cd, Pb, Ag, Cr i Ni u mišićima štuka na obje postaje, značajno povišene koncentracije Tl, Se, Mn i Rb na REF postaji te povišene, ali ne statistički značajno, koncentracije Bi, Cs i As na DRT postaji. Koncentracije Tl izmjerene u mišiću pratile su trend koncentracija u vodi, a Mn i Cs u sedimentu.
2. Analizom biomarkera ustanovljeno je da je aktivnost AchE podjednaka na obje postaje te da nije utvrđena značajna razlika između postaja. Prosječna razina GSH viša je na postaji DRT, no razlika nije bila statistički značajna. Prosječna koncentracija MDA viša je na postaji DRT te je ustanovljena statistički značajna razlika u koncentracijama MDA između postaja.
3. Određivanjem korelacije ustanovljeno je da veličina (dužina) jedinke utječe na koncentraciju određenih metala i aktivnost biomarkera. Arsen se ističe kao metal koji ne prati trend porasta dužine jedinke, dok Bi pokazuje uglavnom pozitivan trend s dužinom odnosno rastom jedinke. Od biomarkera, ističe se AchE, koja pokazuje uglavnom negativnu povezanost s rastom jedinke.
4. Testom ANCOVA ustanovljeno je da razlike u biometriji (veličini) riba na REF i DRT mogu utjecati na zabilježene razlike između postaja u koncentracijama elemenata te je utvrđeno da nakon uklanjanja doprinosa biometrije, koncentracije Mn i Tl ne pokazuju, a As pokazuju značajne razlike između postaja.

5. Utvrđeno je da spol ima ulogu u vrijednosti koncentracije metala te je zabilježeno da jedinke ženskog spola imaju višu koncentraciju Bi, dok jedinke muškog spola imaju višu koncentraciju Co. Navedena razlika u koncentracijama ovih dvaju metala statistički je značajna.
6. Rezultati dobiveni ovim radom donose nove spoznaje o utjecaju industrijskih aktivnosti na vodenu biotu, s naglaskom na ribe te njihove sposobnosti bioakumulacije metala.

6. LITERATURA

- Akerboom T. P., Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods. Enzymol.** 77, 373-382.
- Aktar M.W., Sengupta D., Chowdhury A. 2011. Occurrence of heavy metals in fish: a study for impact assessment in industry prone aquatic environment around Kolkata in India. **Environ. Monit. Assess.** 181, 51-61.
- Al-Gais S. M. 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Mar. Pollut. Bull.** 74, 183-186.
- Bawuro A. A., Voegborlo R. B., Adimado A. A. 2018. Bioaccumulation of Heavy Metals in Some Tissues of Fish in Lake Geriyo, Adamawa State, Nigeria. **J. Environ. Public Health.** 2, 1854892.
- Botsoglou N. A., Fletouris D. J., Papageorgiou G. E., Vassilopoulos V. N., Mantis A. J., Trakatellis A. G. 1994. A rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissues, food, and feedstuff samples. **J. Agric. Food Chem.** 42, 1931-1937.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquat. Toxicol.** 46, 67-76.
- Chapman L., Mackay W., Wilkinson C. W. 2011. Feeding Flexibility in Northern Pike (*Esox lucius*): Fish versus Invertebrate Prey. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 46, 666-669.
- Chételat J., Cott P. A., Rosabal M., Houben A., McClelland C., Belle Rose E., Amyot M. 2019. Arsenic bioaccumulation in subarctic fishes of a mine-impacted bay on Great Slave Lake, Northwest Territories, Canada. **PloS One**, 14, e0221361.
- Coombs T. L. 1980. Heavy metal pollutants in the aquatic environment, U: Gilles, R. (ur.) *Animals and Environmental Fitness: Physiological and Biochemical Aspects of Adaptation and Ecology*, Pergamon, str. 283-302.

Craig J. F. 2008. A short review of pike ecology. **Hydrobiologia** 601, 5-16.

Cukrov N., Cukrov M., Jalžić B., Omanović D. 2008. Koncentracije ekotoksičnih metala (Cd, Pb, Cu i Zu) u vodnom stupcu špilje Živa voda na otoku Hvaru. **Subterranea Croatica** 6, 28-32.

Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Tomec M., Teskeredžić E. 2000. Ribe, bioindikatori kakvoće vode. U: LedECKI Z., ŠIRAC S., RASPOR B. (ur.), 6. stručni sastanak laboratorija ovlaštenih za ispitivanje voda, Zagreb, str. 93-94.

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. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 15, 316-328.

Diamond J.M., Winchester E.L., Mackler D.G., Rasnake W.J., Fanelli J.K., David Gruber D. 1992. Toxicity of cobalt to freshwater indicator species as a function of water hardness, **Aquat. Toxicol.** 22 (3), 163-179.

Domingues G., Düşman E., Vicentini V. E. P. 2020. Cytotoxicity of crude and treated liquid effluents from textile industry dyeing using bioindicator *Allium cepa* L. **Water Air Soil Pollut.** 231, 448.

Dragun Z., Filipović Marijić V., Kapetanović D., Valić D., Vardić Smrzlić I., Krasnići N., Strižak Ž., Kurtović B., Teskeredžić E., Raspor B. 2013. Assessment of general condition of fish inhabiting a moderately contaminated aquatic environment. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 20, 4954-4968.

Dragun Z., Stipaničev D., Fiket Ž., Lučić M., Udiković Kolić N., Puljko A., Repec S., Šoštarić Vulić Z., Ivanković D., Barac F., Kiralj Z., Kralj T, Valić D. 2022. Yesterday's contamination – a problem of today? The case study of discontinued historical contamination of the Mrežnica River (rad poslan u časopis).

Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr., V., Featherstone R. M. 1961. A new and rapidcolorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88-95.

Even J., Ghaffari S. 2011. Determination of cadmium and lead in Northern pike from the Missouri River. **Am. J. Undergrad. Res.** 10, 15-20.

Frančišković-Bilinski S., Bilinski H., Maldini K., Milović S., Zhang Q., Appel E. 2017. Chemical and magnetic tracing of coal slag pollutants in karstic river sediments. **Environ. Earth Sci.** 76, 476-476.

Gaillardet J., Viers J., Dupré B. 2003. Trace elements in river waters. Treatise on Geochemistry, str. 605.

Golombieski J. I., Marchesan E., Camargo E. R., Salbego J., Baumart J. S., Loro V. L., Machado S. L. de O., Zanella R., Baldisserotto, B. 2008. Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.** 65, 340-345.

Gupta S., Singh J. 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: A review. **IIOAB Journal.** 2, 49-57.

Habeković D., Pažur K. 1998. Štuka (*Esox lucius* L.) - njezine osobine i značenje. **Croat. J. Fish.** 56, 55-60.

Hall M. N., Niedzwiecki M., Liu X., Harper K. N., Alam S., Slavkovich V., Ilievski V., Levy D., Siddique A. B., Parvez F., Mey J. L., van Geen A., Graziano J., Gamble M. V. 2013. Chronic arsenic exposure and blood glutathione and glutathione disulfide concentrations in Bangladeshi adults. **Environ. Health Perspect.** 121, 1068-1074.

Hamza-Chaffai A. 2014. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. **Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.** 3, 19-26.

Has-Schon E., Bogut I., Vuković R., Galović D., Bogut A., Horvatić, J. 2015. Distribution and age-related bioaccumulation of lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd), and arsenic (As) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) and European catfish (*Sylurus glanis*) from the Buško Blato reservoir (Bosnia and Herzegovina). **Chemosphere** 135, 289-296.

Hršak V. 2010. Stručna podloga za zaštitu poriječja rijeke Mrežnice. Državni zavod za zaštitu prirode. Preuzeto s http://www.naturaviva.hr/Karlovac_media/Mreznica_podloga_2010.pdf

Karadag H., Firat Ö. 2014. Use of oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* L. for the evaluation of water pollution in Ataturk Dam Lake (Adiyaman, Turkey). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 92, 289-293.

Kelly J. M., Janz D. M. 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. **Aquat. Toxicol.** 92, 240-249.

Kenšová R., Čelechovská O., Doubravová J., Svobodová Z. 2010. Concentrations of metals in tissues of fish from the Věstonice Reservoir. **Acta Vet.** 79, 335-345.

Kumari B., Kumar V., Sinha A. K., Ahsan J. A., Gosh A. K., Wang H., De Boeck G. 2017. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. **Environ. Chem. Lett.** 15, 43-64.

Lionetto M. G., Caricato R., Calisi A., Giordano M. E., Schettino T. 2013. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **Biomed Res. Int.** 321213.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275.

Maradin M. 2007. Mrežnica – važnost rijeke u kršu. Zagreb: Geografski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatsko geografsko društvo. Dostupno na: <https://geografija.hr/528/> (28.5.2022.)

Meister A. 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J. Biol. Chem.** 269, 9397-9400.

Mijošek T., Filipović Marijić V., Dragun Z., Krasnići N., Ivanković D., Erk M. 2019. Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. **Sci. Total Environ.** 660, 1079-1090.

Mohanty D., Samanta L. 2016. Multivariate analysis of potential biomarkers of oxidative stress in *Notopterus notopterus* tissues from Mahanadi River as a function of concentration of heavy metals. **Chemosphere** 155, 28-38.

Nilsson J., Flink H., Tibblin P. 2019. Predator–prey role reversal may impair the recovery of declining pike populations. **J. Anim. Ecol.** 88, 927-939.

Park Y. N., Arvan P. 2004. The acetylcholinesterase homology region is essential for normal conformational maturation and secretion of thyroglobulin. **J. Biol. Chem.** 279, 17085-17089.

Patel H., Rawtani D., Agrawal Y.K., 2019. A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase- a review. **Trends Food Sci. Technol.** 85, 78-91.

Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar. Pollut. Bull.** 32, 225-231.

Pintaeva E. Ts., Bazarsadueva S. V., Radnaeva L. D. Petrov E. A., Smirnova O. G. 2011. Content and character of metal accumulation in fish of the Kichera River (a tributary of Lake Baikal). **Contemp. Probl. Ecol.** 4, 64-68.

Puppel K., Kapusta A., Kuczyńska B. 2015. The etiology of oxidative stress in the various species of animals: a review. **J. Sci. Food. Agr.** 95, 2179-2184.

Rajkowska M., Protasowicki M. 2013. Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophic level in Northwestern Poland. **Environ. Monit. Assess.** 185, 3493-3502.

Roede J. R., Fritz K. S. 2015. Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier.

Scott C.J.W, Morris P.C., Austin B. 2011. Cellular, Molecular, Genomics, And Biomedical Approaches -Molecular Fish Pathology, U: Farrell A P. (ur.), Encyclopedia of Fish Physiology, Academic Press, str. 2032-2045.

Simeon V. 1972. Usporedba biokemijskih svojstava kolinesteraza. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 23, 29-39.

Stehlik L.L., Meise C.J. 2000. Diet of winter flounder in a New Jersey estuary: Ontogenetic change and spatial variation. **Estuaries** 23, 381-391.

Streit B. 1998. Bioaccumulation of contaminants in fish. **EXS**, 86, 353-387.

Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.** 27, 502-522.

Walker C. H. 1998. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. **Environ. Health Perspect.** 106, 613-620.

Wild C. P. 2008. Biomarkers of Exposure and Effect Molecular Epidemiology Unit, Centre for Epidemiology and Biostatistics, Leeds Institute of Genetics, Health and Therapeutics, Faculty of Medicine and Health, University of Leeds, Leeds, U.K.

Zhengwei C. 2005. Lipid Peroxidation. Encyclopedia of Toxicology (Second Edition), Elsevier. str: 730-734.

Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J., Jiang G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Anal. Chim. Acta** 606, 135-150.

Internetski izvori:

URL 1: ResearchGate, A schematic model of bioaccumulation of heavy metals in aquatic food chain

(https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-model-of-bioaccumulation-of-heavy-metals-in-aquatic-food-chain_fig1_357661942, 31.5.2022.)

URL 2: Štukolov u Nacionalnom parku Krka

(<https://tris.com.hr/2021/06/stukolov-u-nacionalnom-parku-krka-opet-lov-na-prozdrljivog-uljeza-stuku/>, 1.7.2022.)

URL 3: Dalmatinski portal

(<https://dalmatinskiportal.hr/energija-i-ekologija/foto-i-video-smanjenje-brojnosti-invazivnih-vrsta-riba-u-proloskom-blatu/77592>, 1.7.2022.)

URL 4: European Environment Agency

(<https://eunis.eea.europa.eu/species/Esox%20lucius>, 1.7.2022.)

URL 5: Animal Diversity Web

(https://animaldiversity.org/accounts/Esox_lucius/, 1.7.2022.)

URL 6: Creative Proteomics

(<https://www.creative-proteomics.com/services/gsh-and-gssg.htm>, 20.5.2022.)

URL 7 : ARKOD preglednik

(<http://preglednik.arkod.hr/ARKOD-Web/>, 22.5.2022.)

URL 8: EPA, Indicators: Fish Assemblage

(<https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-fish-assemblage>, 4.6.2022.)

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. rujna 1998. godine u Zagrebu, gdje sam pohađala Osnovnu školu Pavleka Miškine te Gimnaziju Tituša Brezovačkog. Nakon završetka gimnazije 2017. godine, upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij Znanosti o okolišu upisala sam 2020. godine. Na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka obavila sam Laboratorijsku stručnu praksu na preddiplomskom te Stručnu praksu na diplomskom studiju. Aktivna sam članica Udruge studenata biologije - BIUS te sam autorica članaka za BIUS-ov časopis In Vivo. Sudjelovala sam na projektu "Dabar i voda 2021" Udruge studenata biologije - BIUS. Godine 2020. i 2021. bila sam članica Odbora za društvene mreže i marketing Studentskog zbora Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Volontirala sam u Udruzi Bioteka te sudjelujem u volontiranju u Nacionalnom parku Plitvička jezera u sklopu projekata "Obnova populacije potočne pastrve" i "Uklanjanje invazivnih ribljih vrsta u Nacionalnom parku Plitvička jezera".