

Utjecaj okolišne izloženosti i fizioloških čimbenika na bioakumulaciju metala u jetri štuke (*Esox lucius*)

Cvitanović, Marita

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:217:446553>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marita Cvitanović

**Utjecaj okolišne izloženosti i fizioloških
čimbenika na bioakumulaciju metala u jetri
štuke (*Esox lucius*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala, na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“, pod mentorstvom dr. sc. Zrinke Dragun 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.

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Biomolekule koje vežu metale i zdravstveni poremećaji kod slatkovodnih organizama izloženih industrijskom otpadu“, METABIOM (IP-2019-04-2636).

Zahvaljujem se voditeljici dr. sc. Zrinki Dragun na jako puno strpljenja i volje te odličnom mentorstvu tijekom izrade ovog rada. Nadam se da ćete i dalje uključivati studente u svoj rad i tako im pokazati svijet istraživanja.

Zahvaljujem suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner na neizmjernom trudu, strpljenju, savjetima i usmjeravanjima kroz niz godina studiranja. Fenomenalni ste.

Zahvaljujem se na pomoći na terenu, u laboratoriju i na uvodu u rad na Institutu dr. sc. Dušici Ivanković, Zoranu Kiralju, dr. sc. Damiru Valiću, Tomislavu Kralju, dr. sc. Vlatki Filipović Marijić, dr. sc. Tatjani Mijošek, prof. dr. sc. Emilu Gjurčeviću i doc. dr. sc. Krešimiru Matanoviću.

Zahvaljujem pročelnicama Biološkog odsjeka prof. dr. sc. Ivančici Ternjej i prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac koje su mi kroz teške situacije i uz produktivni razgovor pokazale rad jedne institucije. Obje su izvrstan uzor!

Zahvaljujem se svim profesorima, asistentima i djelatnicima Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu zbog kojih se uvijek mogu vratiti našim zgradama po koju veselu uspomenu.

Veliko hvala mojim roditeljima i bratu na podršci koju sam imala tijekom studiranja, bez vas ne bih mogla bezbrižno uživati u svim prilikama koje su mi se ponudile.

Hvala bivšim i sadašnjim članovima udruge studenata BIUS, omogućili ste mi najljepše trenutke života do današnjeg dana. Nek vas sreća služi sad, a nadam se, i dugo nakon diplome.

Hvala prijateljima što me slušaju u svim mojim izdanjima te nepresušnim poticajima u nadi da postanem što bolja. Zbog vas sam tu.

Ovdje ću nabrojati svoje drage ljude jer znam da ću im tako staviti osmijeh na lice. Hvala ti, Anita Tarandek, Martina Topić, Lana Židak, Sara Stermšek, Erna Tintor, Mia Šepčević, Ana Ercegovac, Ines Maksimović, Tihana Bonevska, Tonka Buha, Daniela Kreber, Iva Ivić, Ana-Marija Bogner, Barbara Dujmić, Nikolina Vitić, Nikola Geršak, Ivan Beno, Hrvoje Butina, Juraj Drnjević, Luka Petrokov, Niko Bujas, Tin Škugor, Filip Bužleta, Tin Bilić... Nakon obrane - častim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj okolišne izloženosti i fizioloških čimbenika na bioakumulaciju metala u jetri štuke (*Esox lucius*)

Marita Cvitanović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovome smo istraživanju odredili ukupne te prvi put i citosolske koncentracije 19 elemenata u jetrama štuka (*Esox lucius*) s dviju postaja na rijeci Mrežnici (REF: referentna; DRT: postaja ispred nekadašnje tvornice tekstila). Koncentracije Bi, Cs, Cu, Fe, Se i Zn bile su više na DRT postaji kao znak utjecaja povijesnog onečišćenja, a Mn, Mo i Tl na REF postaji, vjerojatno uslijed utjecaja poljoprivrede, što se podudara s onečišćenjem vode i sedimenta rijeke Mrežnice. Visoka zastupljenost (>70%) u citosolskoj frakciji jetre zabilježena je za veći broj elemenata (npr., Ag, As, Bi, Cd, Cs, Cu), što upućuje na njihovu potencijalnu toksičnost. Utvrdili smo da veličina, spol i način ishrane štuka (veća ili manja zastupljenost ribe u prehrani) mogu utjecati na koncentracije nekih elemenata akumuliranih u njihovim jetrama. Koncentracije Bi, Cs i Fe bile su više u većim ribama, a Ca u manjim. Koncentracije Bi bile su više u ženkama, a Mo i Zn u mužjacima. Koncentracije As, Mn i Na bile su više u štukama sa zelenim jetrama (prehrana vjerojatno bogatija beskralješnjacima), a Bi, Cs i Fe u štukama sa žutim jetrama (prehrana vjerojatno bogatija ribama). Rezultati ovoga rada doprinose boljem poznavanju bioakumulacije metala/metaloida u jetri štuke kao značajnog bioindikatorskog organizma.

(91 stranica, 31 slika, 13 tablica, 106 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: citosol, bioraspoloživost, ICP-MS, Mrežnica

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: Dr. sc. Zrinka Dragun
Komentor: Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
Prof. dr. sc. Ivančica Ternjej
Doc. dr. sc. Luka Valožić
Prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

Rad prihvaćen: 8.9.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Impact of environmental exposure and physiological factors on metal bioaccumulation in the liver of northern pike (*Esox lucius*)

Marita Cvitanović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Total and, for the first time, the cytosolic concentrations of 19 elements were determined in the northern pike (*Esox lucius*) liver from two locations at the Mrežnica River (REF: reference; DRT: in front of the former textile factory). Bismuth, Cs, Cu, Fe, Se, and Zn concentrations were higher at DRT as a sign of historical contamination impact, and Mn, Mo and Tl at REF, probably due to agricultural impact, which is consistent with water/sediment contamination of the Mrežnica River. High percentage of several elements in cytosol (>70%) (e.g., Ag, As, Bi, Cd, Cs, Cu) indicated their potential toxicity. Size, sex and diet composition (more or less fish in the food) were shown to sometimes influence metal/metalloid accumulation in the northern pike liver. Bismuth, Cs and Fe concentrations were higher in bigger fish, Ca in smaller. Bismuth concentrations were higher in females, Mo and Zn in males. Arsenic, Mn and Na concentrations were higher in specimens with green liver (diet probably rich in invertebrates), Bi, Cs and Fe in specimens with yellow liver (diet probably rich in fish). The results of this thesis contribute to better understanding of hepatic metal/metalloid accumulation in the northern pike as an important bioindicator organism.

(91 pages, 31 figures, 13 tables, 106 references, original in: Croatian)

Keywords: cytosol, bioavailability, ICP-MS, Mrežnica

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Zrinka Dragun, PhD
Co-mentor: Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD
Reviewers: Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD
Prof. Ivančica Ternjević, PhD
Assist. Prof. Luka Valožić, PhD
Prof. Blanka Cvetko Tešović, PhD

Thesis accepted: 8.9.2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Onečišćenje slatkovodnih ekosustava metalima	1
1.2. Bioindikatorski organizmi	2
1.3. Štuka (<i>Esox lucius</i>)	3
1.4. Ciljni organi za analize bioakumulacije metala	5
1.5. Sindrom zelene jetre	7
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	9
3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	10
3.1. Geološka podloga Mrežnice	12
3.2. Hidrogeološki aspekti područja Mrežnice	12
3.3. Geografske i povijesne značajke istraživnog područja	13
3.4. Istraživane lokacije	14
4. MATERIJALI I METODE	19
4.1. Terenski rad - uzorkovanje štuka	19
4.2. Laboratorijski rad - priprema jetrenih homogenata i izolacija citosolskih frakcija	22
4.3. Laboratorijski rad - razgradnja homogenata i citosola	23
4.4. Odabrana metoda određivanja koncentracija metala i metaloida	24
4.5. Laboratorijski rad – mjerenje koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata	25
4.6. Obrada i statistička analiza rezultata	28
5. REZULTATI	29
5.1. Biometrijski pokazatelji štuka iz rijeke Mrežnice	29
5.2. Ukupne i citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u jetri štuka iz rijeke Mrežnice	32
5.3. Zastupljenost elemenata u tragovima i makroelemenata u citosolskoj frakciji jetre štuke	38
5.4. Utjecaj fizioloških čimbenika na citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u jetrama štuka	40
5.4.1. Utjecaj veličine kao fiziološkog čimbenika	40
5.4.2. Utjecaj načina prehrane, odnosno razlike između štuka sa žutim i zelenim jetrama	48
5.4.3. Utjecaj spola, odnosno razlike između mužjaka i ženki	52

6.	RASPRAVA	55
	6.1. Ukupne i citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u jetrama štuka iz rijeke Mrežnice – razlike između postaja	56
	6.2. Zastupljenost elemenata u tragovima i makroelemenata u citosolskoj frakciji jetre štuke.....	58
	6.3. Utjecaj veličine kao fiziološkog čimbenika	61
	6.4. Usporedba citosolskih koncentracija u štukama sa žutim i zelenim jetrama	62
	6.5. Povezanost spola i citosolskih koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata	63
7.	ZAKLJUČAK	65
8.	LITERATURA	66
9.	ŽIVOTOPIS

POPIS KRATICA

AAS - atomska apsorpcijska spektrometrija

ICP-AES - atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom

ICP-MS - spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom

DMT1 - Divalentni Transporter Metala 1

REF - referentna postaja

DRT - postaja Duga Resa / tvornica tekstila

FCI - Fultonov kondicijski indeks

Milli-Q – ultračista voda

1. UVOD

1.1. Onečišćenje slatkovodnih ekosustava metalima

Na kakvoću površinskih voda utječu prirodni čimbenici i ljudske aktivnosti, poput industrije, poljoprivrede i urbanizacije. Ispuštanje komunalnih i industrijskih otpadnih voda te ispiranje pesticida i gnojiva s poljoprivrednih zemljišta posebno su značajni za unos zagađivala u rijeke i druge vodotoke (Giri i Qiu 2016; Sunjog i sur. 2016; Dragun i sur. 2019; Shi i sur. 2020). U skladu s tim, izvore onečišćenja dijelimo na točkaste i netočkaste (ili difuzne) izvore. Točkasti izvor je lako prepoznatljiv (na primjer, ispuštanje kanalizacijskog postrojenja ili tvornice) te se lakše sanira, dok je netočkasti izvor (na primjer, ispiranje s poljoprivrednog zemljišta ili prometnica) znatno složeniji zbog brzog širenja zagađivala interakcijom vode i okolnog krajobraza (Chiwa i sur. 2012; Giri i Qiu 2016). Povećani unos raznih zagađivala u okoliš putem obiju vrsta izvora podrazumijeva i potencijalno veći unos u živa bića čiji je zagađeni okoliš stanište.

Osim što uzrokuju lošiju kakvoću vode, ljudske aktivnosti stvaraju pritisak na akvatičke ekosustave i promjenama izgleda staništa (npr. kanaliziranje toka), kao i uvođenjem invazivnih vrsta. Ipak, pojedine promjene u statusu akvatičkih sustava, poput onečišćenja zagađivalima, mogu se nadzirati i držati pod kontrolom putem redovitog praćenja stanja, odnosno monitoringa (Chovanec i sur. 2003; Shi i sur. 2020). Među zagađivalima značajno je istaknuti metale, čija prisutnost u raznim vrstama otpadnih voda predstavlja velik rizik za vodene ekosustave. Vlažna staništa sadrže metale u stupcu vode u otopljenoj i partikularnoj fazi (frakcija prikupljena na filteru promjera pora 0,45 μm smatra se partikularnom, dok se frakcija koja prolazi kroz filter definira kao otopljena; Dragun i sur. 2009), pohranjene u sedimentu (adsorbirane na mineralne ili organske čestice; Robbe, 1984) te akumulirane u organima vodenih organizama. Metali u organizme dospijevaju filtriranjem vode, unosom kroz prehranu i apsorpcijom kroz kožu (Fichet i sur. 1998; Dragun i sur. 2018). Metali se ne razgrađuju pomoću živog svijeta te imaju sklonost bioakumulaciji u raznim vodenim organizmima poput fitoplanktona, zooplanktona i naposljetku riba, što može imati ozbiljne posljedice za zdravlje tih organizama u obliku oksidativnog stresa, promjena u endokrinom i imunološkom sustavu (Zamora-Ledezma i sur. 2021) te konačno i smanjenja bioraznolikosti. Živim bićima su neki

metali potrebni u većoj količini u odnosu na druge (Depledge i Rainbow 1990). Metale koji se u organizmima javljaju u većim količinama (čak i u miligramima po gramu tjelesne težine) nazivamo makroelementima, a to su K, Na, Ca i Mg. Njihove funkcije su regulatorne te održavaju strukturu stanice (osmotski tlak, potencijal membrane, itd.). Metale i metaloide koji se u organizmima javljaju u znatno nižim koncentracijama (< 100 mikrograma po gramu) nazivamo elementima u tragovima te ih nadalje dijelimo na esencijalne i nesencijalne. Esencijalni elementi u tragovima, poput Cu, Fe i Zn, u malim su koncentracijama značajni za rad organizma (O'Dell i Sunde 1997), gdje sudjeluju u raznim metaboličkim procesima. Mogu, na primjer, biti sastavni dijelovi respiratornih pigmenta i enzima; ugljična anhidraza te nekoliko dehidrogenaza sadrže Zn, hemocijanin sadrži Cu, a hemoglobin Fe (Depledge i Rainbow 1990). I esencijalni elementi mogu biti toksični, ali tek u vrlo visokim koncentracijama. Nesencijalni elementi, poput Cd, Cs i Tl, nemaju poznate funkcije u organizmima. Dođe li do njihove akumulacije na mjestu aktivnih metaboličkih procesa, toksični su već pri vrlo niskim koncentracijama (Depledge i Rainbow 1990; Dragun i sur. 2018). Izloženost relativno niskim koncentracijama metala može izazvati stres, nedovoljan da usmrti jedinku, ali koji može dovesti do promjena na staničnoj razini te uzrokovati i neke vidljive promjene na organizmu poput zaostajanja u rastu i razvoju (Matouke i Mustapha 2020). Toksičnost metala može se ograničiti vezanjem za protein metalotionein ili inertne granule te izlučivanjem iz stanice, dok njihovo vezanje za enzime i organele u stanici može izazvati štetne učinke (Mason i Jenkins 1995; Klaassen i sur. 1999; Wallace i sur. 2003; Dragun i sur. 2018). Intenzitet bioakumulacije metala u organizmu životinja zavisit će o metalu, kao i o ciljnom organu. Metali u organizmu mogu međusobno utjecati na bioakumulaciju i toksičnost, i to na antagonistički ili sinergistički način, a u nekim slučajevima međusobni utjecaj može potpuno izostati (Amiard-Triquet i Amiard 1998; Otitoloju 2002; Goto i Wallace 2007).

1.2. Bioindikatorski organizmi

Za praćenje štetnog utjecaja metala u vodenim ekosustavima primjenjuju se bioindikatorski organizmi, među kojima se često koriste ribe. Osim riba, kao bioindikatorski organizmi stanja slatkovodnih ekosustava koriste se školjkaši i rakovi (Krasnići 2019). Od 19. stoljeća zajednice riba se koriste za klasifikaciju toka rijeke (zonaciju) budući da žive u staništima usko vezanim

i karakterističnim za njih. Navedeno se smatra jednim od prvih primjera bioindikacije. Ribe se koriste za opisivanje obilježja staništa i provjeru njegovog stanja jer postoji velik obim istraživanja iz područja ekologije, fiziologije i ekotoksikologije riba čiji rezultati točno navode ekološke potrebe velikog broja vrsta. S obzirom da postoje povijesni podaci o stanju ribljih zajednica moguća je rekonstrukcija i povratak prvotnog ekosustava u slučaju onečišćenja staništa. Tijekom ličinačkog i juvenilnog stadija ribama su potrebni različiti stanišni uvjeti što ih čini pogodnim indikatorom ekološkog stanja rijeke (Chovanec i sur. 2003).

Životni vijek ribe je dovoljno dug da bi se u njenim tkivima primijetili procesi akumulacije elemenata iz okoliša. Ribe zadovoljavaju više kriterija za biološki monitoring. Primjerice, nalaze se na vrhu prehrambenog lanca te stoga odražavaju onečišćenje cijeloga sustava. Osjetljive su na uzročnike stresa. Različita razina izloženosti zagađivalima izaziva reakcije različitog intenziteta. Također, ribu u ulozi bioindikatora obilježava široka rasprostranjenost i život u raznim staništima, što omogućuje primjenu istih metoda na više mjesta i daje reprezentativne i usporedive rezultate stanja okolišnih čimbenika (Chovanec i sur. 2003). Nedostatak primjene riba je mogući utjecaj različitih fizioloških čimbenika na stupanj bioakumulacije zagađivala poput metala, što može otežati jasnu procjenu stanja okoliša. Ribe su migratorni organizmi te analiza njihovih organa prikazuje dugotrajnu izloženost koja može, ali i ne mora biti vezana uz specifičnu lokaciju koja je cilj istraživanja (Krasnići 2019). Često korišteni bioindikator među slatkovodnim ribama je štika (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) jer ispunjava navedene uvjete dobrog bioindikatora, a to su široka rasprostranjenost, osjetljivost na uzročnike stresa, reprezentativnost, nalazi se na vrhu prehrambenog lanca i raznoliko se hrani kroz stadije razvoja (Berghaus i sur. 2019).

1.3. Štika (*Esox lucius*)

Štika (*E. lucius*) spada u porodicu Esocidae (grč. *isox*; riba). Izdužen oblik tijela je karakterističan za lovca iz zasjede (Craig 2008), ima spljoštenu glavu, velike oči te leđnu i analnu peraju u blizini repa (Slika 1). Baza repa je široka zbog veličine repnih mišića koji omogućuju brz i silovit pokret. Boja tijela ovisi o okolišu u kojem štika obitava, najčešće je zeleno-žuta sa svjetlijim pjegama i trbuhom (Jakšić 2018).

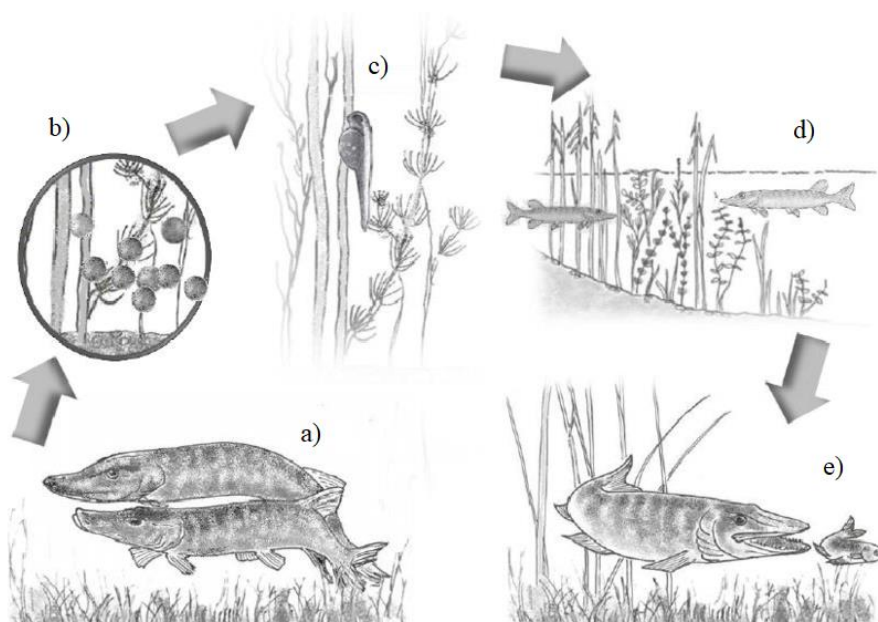


Slika 1. Štuka (*Esox lucius* Linnaeus, 1758). Izvor: USFWS National Digital Library (2018). Autor: Timothy Knepp

Vršni je predator, pokazuje veliku prilagodljivost pri odabiru plijena i iznimnu vještinu u širenju staništa. Navedena ponašanja su moguća zbog eurivalentnosti vrste, odnosno visoke tolerancije na različite ekološke čimbenike, uključujući i nisku koncentraciju kisika (Berghaus i sur. 2019). Na rast i mortalitet štuke najviše utječu temperatura, prozirnost vode, produktivnost, dostupnost plijena i gustoća jedinki iste vrste te ostalih predatora. Hrani se drugim vrstama riba i raznim beskralješnjacima, u što je uključen i kanibalizam. Čest je primjer većih štuka koje se hrane manjima. Štuka je piscivor te ujedno i ključna vrsta, što znači da izravno utječe na evoluciju, adaptaciju i morfologiju drugih riba (ali i drugih štuka) u staništima hladnih površinskih voda (Craig 2008).

Štuke su rasprostranjene na europskom, azijskom i sjeverno-američkom kontinentu (IUCN 2011) i nastanjuju rijeke, jezera i bočate vode. Životni ciklus štuke (Slika 2) započinje odlaganjem jaja koje oplođuje jedan mužjak. Za mrijest je potrebna vegetacija (vodena ili kopnena, živa ili truleća) za koju će se jajašce pričvrstiti, plićak, zaštita od vjetra i nedostatak vodene struje. Gubitak močvarnih područja, smanjenje zasjenjenosti tekućica i eutrofikacija negativno utječu na makrofitsku vegetaciju koja predstavlja sklonište i zaštitu štukama već od samog stadija oplođenog jajašca (Craig 2008). Nastali embrij svoju žumanjčanu vrećicu reapsorbira u 5 do 16 dana. Slijedi stadij slobodnog embrija koji također može biti vezan za truleću vegetaciju ili lišće posebnim adhezivnim papilama. Kako štuka raste smanjuju se adhezivni organi te se plivači mjehur puni zrakom i jedinka postaje sposobna za plivanje. Kad dosegne veličinu od približno 20 cm migrira u područje rjeđe vegetacije. Beskralješnjaci na makrofitima poslužit će štuki u stadiju embrija kao hrana. Hrani se malim račićima i ako su

dostupni, većim rakovima, ličinkama insekata i ribama (Bry 1996). Tijekom životnog stadija sa žumanjčanom vrećom štuke su izrazito podložne predaciji. U laboratorijskim istraživanjima najviše jedinki su usmratile ličinke *Dytiscus marginalis* Linnaeus, 1758 i *Anax imperator* Leach, 1815. Oba kukca su generalisti i oportunisti. U akvarijima se *Dytiscus* zbog izrazito dobrih kemoreceptora može prehraniti još nepokretnim jajima štuka, dok mu mehanoreceptori omogućavaju prepoznavanje pokretnih jedinki (Le Louarn i Cloarec 1996). Odrasle i subadultne štuke nisu toliko vezane za vegetaciju, ali ju koriste kao zaklon iz kojeg love plijen (Bry 1996).



Slika 2. Životni ciklus štuke: a) mrijest; b) i c) jajašca i ličinka štuke pričvršćene na vodeno bilje; d) i e) stadiji života štuke koje provodi u rjeđoj vegetaciji. Izvor: Jacobsen i Engström-Öst 2020.

1.4. Ciljni organi za analize bioakumulacije metala

Na koncentraciju bioakumuliranog metala u organima riba utječu biotički i abiotički čimbenici. Kemijski oblik metala koji se nalazi u vodi, temperatura i pH su neki od primjera, ali važnost imaju i dob same ribe, spol, težina i način prehrane (Has-Schön i sur. 2006). Dva

su značajna načina kako metali dospijevaju u organizam ribe: kroz škrge i ingestijom kontaminirane hrane, kroz usta (Chovanec i sur. 2003).

Škrge kao organ služe prvenstveno za izmjenu plinova (Olsson i sur. 1998) i reguliranje transporta iona. U vodi se nalazi manja količina kisika nego u zraku, što znači da za jednu litru zraka koji sisavac udahne, kroz škrge mora proći 20 litara vode. Niske koncentracije metala u vodi ne utječu na normalan rad škrge, no visoke koncentracije uzrokuju oštećenja i nakupljanje sluzi što može dovesti i do gušenja (Playle 1998).

Škrge posjeduju specijalizirane stanice za transport metala koje se nazivaju kloridne stanice. Divalentni ioni metala (Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) ulaze u kloridnu stanicu putem istog transportera što ga koristi i Ca^{2+} , dakle sva se četiri metala natječu za isto vezno mjesto. Stoga veća tvrdoća vode (odnosno povišena koncentracija kalcija u vodi) smanjuje unos ostalih metala (Co^{2+} , Zn^{2+} i Cd^{2+}) u organizam, stvarajući tako zaštitu od njihove potencijalne toksičnosti (Bradley i Sprague 1985 a i b, Wicklund i Runn 1988, Comhaire i sur. 1994; Olsson i sur. 1998).

Ulaskom metala u tijelo ribe kroz probavni trakt dolazi do doticaja metala s površinom epitelnih stanica što potiče stvaranje sluzi. Ona zadržava metale u sebi te tako smanjuje njihov unos u tijelo (Sorenson 1991). Divalentni metali, kao Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} , u epitel crijeva dospijevaju pomoću transportnog proteina nazvanog Divalentni Transporter Metala (DMT1) (Mims i Prchal, 2005).

Nakon unosa metali se šire tijelom kroz krvožilni sustav vezani za transportne proteine. U tkivima sudjeluju u metaboličkim reakcijama ili su detoksicirani vezanjem na granule i metalotioneine (Olsson i sur. 1998), proteine koji sudjeluju u homeostazi i detoksikaciji metala u stanicama (Dragun i sur. 2022a). U riba, metalotionein se koristi kao biomarker zagađenja slatkovodnog i morskog okoliša (Hylland i sur. 1992).

Kao ciljni organi za praćenje bioakumulacije metala mogu se stoga koristiti razni organi riba, pa su tako u prijašnjim istraživanjima korištene škrge (Playle 1998; Dragun i sur. 2007, 2019), mišići (Dutta i sur. 2019), jetra (Dragun i sur. 2018, 2019), bubrezi (Has-Schön i sur. 2008) i probavilo (Mijošek i sur. 2021). Najpouzdaniji indikatori dugotrajne izloženosti u okolišu su jetra i bubrezi, zbog njihove uloge u metabolizmu i izlučivanju metala (Miller i sur. 1992).

Najčešće korišteni ciljni organ za analize bioakumulacije metala u ribama je jetra, zbog svoje dominantne funkcije u procesima pohrane, metabolizma i detoksikacije, uslijed čega taj

organ u pravilu ima i najviše koncentracije akumuliranih metala u odnosu na ostale organe riba (Dragun i sur. 2019). U jetri se nalazi i visoka koncentracija metalotioneina u odnosu na druge organe (Hylland i sur. 1992). Dosadašnja istraživanja bioakumulacije metala u jetrama štika odnosila su se na određivanja koncentracija ukupno akumuliranih metala (Đikanović i sur. 2016; Luczynska i sur. 2019), dok podaci o udjelu i ponašanju metala u citosolskoj frakciji jetri, koji su potencijalno toksični, nisu dostupni u znanstvenoj literaturi, kao ni informacije o ovisnosti njihove bioakumulacije o fiziološkim čimbenicima.

1.5. Sindrom zelene jetre

Neobičan fenomen koji se može primjetiti kod nekih riba je pojava zelene boje jetre. Kod štuke je tako zabilježena zelenkasta boja bukalne sluznice i svih tkiva (Evensen 2006), dok je zelena boja same jetre uočena kod nekoliko vrsta riba (japanski gof, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel, 1845, Maita i sur., 1997; Takagi i sur., 2005; japanski pagar, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843), Takagi i sur. 2006; žuti som, *Pelteobagrus fulvidraco* Richardson, 1846, Cai i sur., 2020). Postoji više predloženih objašnjenja za pojavu „sindroma zelene jetre“. Zelena jetra primjećena u žutog soma (*P. fulvidraco*) smatra se posljedicom prehrane s visokim udjelom biljnog sadržaja. Sindrom uzrokuje povećanu smrtnost i oslabljenu toleranciju na stres, dok kod somova hranjenih ribom ne dolazi do pojave zelene jetre (Cai i sur. 2020). Takagi i sur. (2006) opisali su da je uzrok ove pojave manjak aminokiseline taurina zbog smanjenog udjela ribe u prehrani. Sakaguchi i Hamaguchi (1979) objavili su da bi uzrok mogao biti fiziološki učinak uslijed niske temperature vode zimi. Simulacijom zime, tj. održavanjem niske temperature vode (7,7-12,9 °C), autori su uočili da se nakon 11 tjedana sporadično pojavljuje sindrom zelene jetre u japanskog pagra.

Prema Takagiju i sur. (2006), dodatak aminokiseline taurina prehrani riba uklonio bi pojavu ovoga sindroma. Taurin je esencijalna aminokiselina kod nekih vrsta riba, posebno u juvenilnom i ličinkačkom stadiju. Sintetizira se u jetri (Sampath i sur. 2020), a nalazi se u mozgu, jetri, mišićima i bubrezima. Sudjeluje u osmoregulaciji i zaštiti tkiva, sintezi žuči, inhibiciji neurona i pohrani energije. Ima ulogu u stabilizaciji proteina, ali mehanizam još nije poznat (Bruździak i sur. 2017). Dodatkom taurina prehrani ribe povećava se sveukupna količina proteina, posebno proteina toplinskog šoka, i smanjuje apoptoza crvenih krvnih stanica (Sampath i sur. 2020). Kod riba u čijoj prehrani nedostaje taurin, smanjena je pretvorba

biliverdina, zelenog pigmenta žuči, u bilirubin te se biliverdin zadržava u jetri (Takagi i sur., 2005; Goto i sur. 2001). Bilirubin i biliverdin su žučni pigmenti koji u kompleksima s proteinima mogu pružiti zaštitu organizmu od toksičnosti metala, kompleksirajući ih. Opisano je njihovo vezanje za ione Cd, Cu, Zn i Mn (Goncharova i Urbanova 2009). Goncharova i Urbanova (2009) su također predložile mogućnost da ovi pigmenti, budući da su dobri kelatori, vjerojatno mogu inaktivirati enzime koji sadrže Zn, vezanjem na njihove atome Zn.

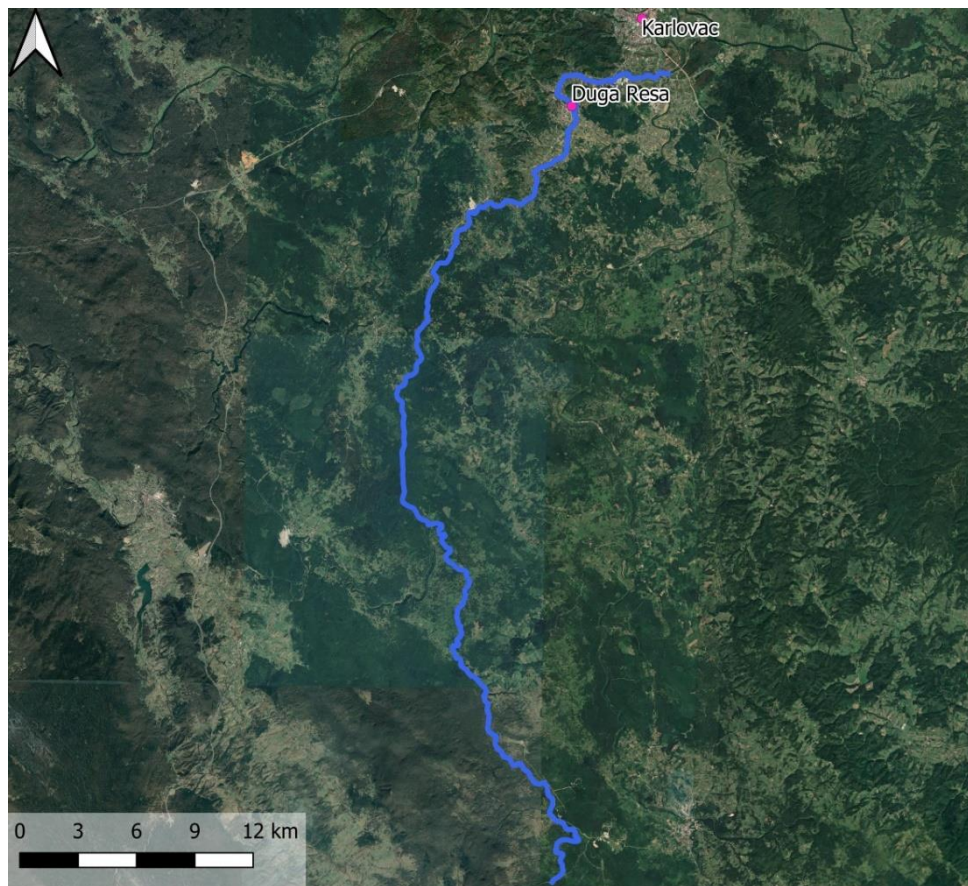
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Razni elementi u tragovima te posebno makroelementi neizostavni su za normalnu funkciju svih organizama te ih nazivamo esencijalnim elementima. Njihove povišene koncentracije, a osobito povišene koncentracije neesencijalnih elemenata akumuliranih u organima riba, mogu ozbiljno ugroziti zdravlje tih riba, ali i ljudi koji se njima hrane. Štuka (*E. lucius*) je vršni predator te filtracijom vode i ingestijom plijena može akumulirati u svojim organima razna zagađivala, pa tako i metale, posebno u slučaju povišene izloženosti neesencijalnim metalima za koje ne postoji sustav regulacije. Štuka je stoga odličan primjer bioindikatorskog organizma za procjenu izloženosti metalima i njihovih toksičnih učinaka u akvatičkim sustavima koji su izloženi antropogenom utjecaju, poput industrije ili poljoprivrede. Takav je sustav i rijeka Mrežnica koja je dijelom svog toka izložena utjecaju okolnih poljoprivrednih aktivnosti dok je u području grada Duge Rese tijekom razdoblja od više od sto godina bila izložena otpadnim vodama tvornice tekstila. Za praćenje utjecaja onečišćenja rijeke na ribe, potrebno je izabrati ciljni organ koji će biti prikladan za ostvarivanje ciljeva istraživanja, pa je jetra, kao glavni organ za metaboličke procese, pohranjivanje i detoksikaciju, kao i organ s uobičajeno najvišim koncentracijama akumuliranih metala, odabrana za ovo istraživanje. Međutim, jedinke štuke mogu se međusobno razlikovati u brzini unosa, potrebi za metalima i načinu na koji se metali raspođjeljuju unutar stanica i tkiva. Na te razlike mogu utjecati različiti fiziološki čimbenici, poput spola, načina prehrane, veličine i slično. U skladu s navedenim, cilj ovoga istraživanja je produbljivanje znanja o bioakumulaciji metala u jetri štuke, dok su specifični ciljevi sljedeći:

- istražiti povezanost između koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata izmjerenih u jetrama štuca i razina izloženosti tim elementima na dvjema postajama rijeke Mrežnice (referentnoj i onečišćenoj);
- istražiti raspodjelu elemenata u tragovima i makroelemenata između topljivog i netopljivog dijela tkiva, radi utvrđivanja potencijalne toksičnosti bioakumuliranih elemenata, te ispitati kako se udio pojedinih elemenata u topljivom dijelu stanice mijenja pri porastu razine njihove bioakumulacije;
- istražiti utjecaj nekoliko fizioloških čimbenika (veličina, način prehrane i spol) na koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata akumuliranih u jetri štuca.

3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Uzorkovanje štika provedeno je u proljeće 2021. godine (22.-23. travnja i 1. svibnja) u nizinskom dijelu toka rijeke Mrežnice (Slike 3 i 4). Mrežnica je rijeka Kordunskog područja duga 64 km, i u cijelosti se nalazi unutar Republike Hrvatske. Izvire u špilji ispod Popovića vrha (479 mnv), teče prema sjeveru i završava ušćem u rijeku Koranu kao njena lijeva pritoka. Korana utječe u rijeku Savu, koja zatim utječe u Dunav, što Mrežnicu čini rijekom crnomorskog slijeva.

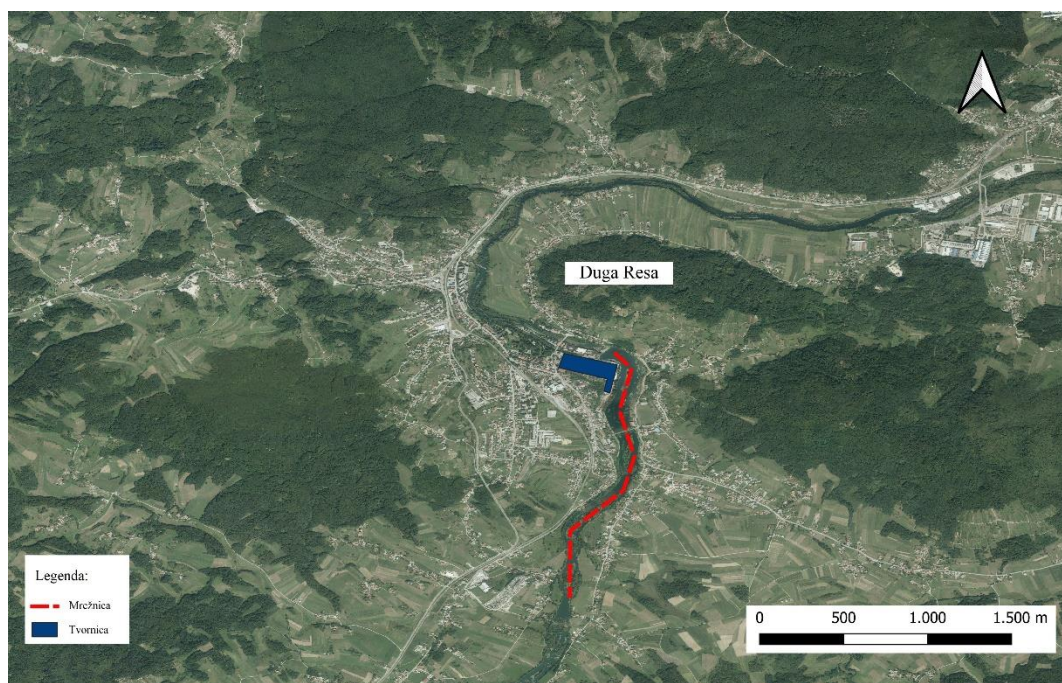


Tumač oznaka

— Mrežnica

Slika 3. Prikaz rijeke Mrežnice; vidljiva su dva grada, Duga Resa i Karlovac, kao moguća područja onečišćenja rijeke. Karta je izrađena 2022. godine u QGIS-u (QGIS, 3.16.4-Hannover; podatci uzeti sa Geoportala; WGS84). Autorica fotografije: Marita Cvitanović.

Njena posebnost nalazi se u 93 sedrena slapa koji presijecaju rijeku i tvore ujezerenja. Uz slapove, bujni makrofiti, razvedenost i raznolikost reljefnih oblika čine rijeku jedinstvenom (Hršak 2010). Podloga doline Mrežnice je plitki krš od većinom jurskih i krednih vapnenaca. Hidrološki proces koji prevladava od izvora do naselja Belavići dubinska je erozija, kojom je oblikovan i sam kanjon. Taj proces zamjenjuje bočna erozija nizvodno od Belavića nailaskom na sedrene barijere. Uz barijere započinje nizinsko područje doline te ona postaje asimetričnija, šira i povoljnija za naseljavanje nego gornji dio toka. Na veću naseljenost nizinskog dijela toka utjecala je i izgradnja Jozefinske ceste 1779. iz Karlovca prema Senju te željeznička pruga Karlovac-Rijeka dovršena 1873. godine (Maradin 2007).



Slika 4. Uvećani prikaz dijela toka rijeke Mrežnice gdje je provedeno istraživanje, s označenim gradom Duga Resa i nekadašnjom tvornicom tekstila u Dugoj Resi. Karta je izrađena 2022. godine u QGIS-u (QGIS, 3.16.4-Hannover; podatci uzeti sa Geoportala; WGS84). Autorica fotografije: Marita Cvitanović.

3.1. Geološka podloga Mrežnice

Krški reljefni oblici Kordunskog područja koje okružuje Mrežnicu imaju sjeverozapadno – jugoistočni pravac pružanja, tipično za protezanje dinarskih reljefnih struktura.

Tektonski procesi Korduna su navlačni, još od paleozoika (razdoblje prvih riba) do danas. Najstarije stijene pripadaju donjem trijasu, a najveću površinu zauzimaju jurske i kredne naslage. Stijene paleogena i neogena (razdoblje diversifikacije sisavaca) postoje samo u fragmentima zbog erozije i kvartarne (zadnje glacijalno razdoblje) tektonike. Stijene donjeg trijasa su tinjčasti siliti, pješčenjaci i dolomiti. Na njih se slažu dolomitični vapnenci gornjeg trijasa, zatim dolomiti s lećama vapnenaca te rožnjacima i pločasti, mrljasti i čisti vapnenci jurskog razdoblja. Stijene krede predstavljaju grebenski, bioakumulirani i foraminiferski vapnenci te u manjoj debljini dolomiti i breče. Fragmenti stijena tercijara su breče, brečo-konglomerati, pješčenjaci i lapori, neogeni šljunci, pijesci i boksit (Hršak 2010).

Aluvijalni nanosi i udoline najtanjeg su sloja i kvartarne starosti. Strukturno-tektonski oblici koje čine navedene stijene sadrže mnoge uzdužne lomove koji presijecaju normalne i inverzne bore, navlake i reversne rasjede. Rasjedne linije prvog reda intenziteta prate uzdužne i poprečne lomove i čine korita Mrežnice i njenih pritoka, a rasjedne linije drugog i trećeg reda uzrokuju skretanje tokova (Hršak 2010).

3.2. Hidrogeološki aspekti područja Mrežnice

Hidrogeološka građa prostora zaslužna je za izgled Mrežnice i njenih podzemnih i nadzemnih pritoka. Jedna od glavnih hidrogeoloških karakteristika tekućice je propusnost njene podloge koja može biti dobro vodopropusna, slabije vodopropusna ili vodonepropusna. O tome ovisi stanje, ponašanje i stupanj bioraznolikosti tekućice (Hršak 2010).

Dobro vodopropusni sedimenti Kordunskog područja Mrežnice su kredni karbonati, primjerice vapnenci s lećama dolomita i dobro uslojeni jurski vapnenci. Njihovi slojevi su velike debljine, okršeni i vrlo raspucani – puni rasjeda, škrapa i podzemnih špilja i jama. Također su zaslužni za kanjonski izgled gornjeg toka Mrežnice. Kao što samo ime kaže, navedene stijene propuštaju površinsku vodu u podzemlje te se ona zaustavlja kad naiđe na naslagu slabije propusnosti i rezultira velikom izdašnosti vode (Hršak 2010).

Slabije vodopropusni sedimenti imaju manju provodnost zbog užih pukotina. Izdašnost vode ovisi o razini podzemne vode okolnog prostora. Stijene takve karakteristike su većinom jurske starosti – pločasti, pločasti mrljasti i algalni vapnenci, vapnenci i dolomiti s rožnjacima i dolomiti s ulošcima dolomitnih breča ili grebenskih vapnenaca. Slabije vodopropusne stijene krede su dolomiti i breče te pijesci i šljunci tercijara (Hršak 2010).

Sedimenti koji čine barijeru i sprečavaju otjecanje podzemnih i površinskih voda nazivaju se vodonepropusnim. To su šejlovi, pjeskoviti i kalcitni lapori, piroklastiti, tufitični klastiti i pješčenjaci, tinjčasti siliti, sitnozrni dolomiti, brečokonglomerati i breče. Navedeni sedimenti su nastali u trijasu (Hršak 2010). Postoje i vodonepropusni tercijarni i kvartarni sedimenti, ali oni su fragmentirani i zauzimaju malu površinu područja. Karakterizira ih slaba izdašnost i međuzrnska i pukotinska poroznost. Uobičajeno za kvartarne sedimente je posjedovanje kombinacije stupnja vodopropusnosti, primjerice kod *terre rosse*, aluvija, proluvija i deluvija, pijeska, šljunka, gline i jezerskih glinovitih naslaga. Provodnost je najčešće vrlo slaba, a poroznost međuzrnska. Dobrim poznavanjem hidrogeološke strukture porječja Mrežnice brzo i precizno se može odrediti izvor potencijalnog onečišćenja i učinkovito sanirati (Hršak 2010).

3.3. Geografske i povijesne značajke istraživanog područja

Reljef porječja Mrežnice je brdovit i ispresijecan nizinama koje ispunjavaju rijeke i potoci te kanjonima Tounjčice i Mrežnice. Najviši vrh je Bakarni s 515 mnv (Hršak 2010). Grad Duga Resa spominje se 1380. godine prvi put, ali arheološki nalazi pokazuju naseljenost još od antičkog i rimskog doba, čak i prapovijesti. Nalazi se u Karlovačkoj županiji, jugozapadno od Karlovca. Tijekom srednjeg vijeka Duga Resa je imala obrambenu ulogu protiv Turaka, a pri kraju 19. st. započinje gospodarski razvoj izgradnjom pruge i uspostavom pamučne industrije (Grad Duga Resa, Službene stranice 2022). Godine 1884. Josef Jerusalem, trgovac iz Beča, kupio je mlin u Dugoj Resi na Mrežnici i osnovao „Kraljevsku zemaljsku ovlašćenu predionicu i tkaonicu“. Tkaonica je imala izrazito povoljan položaj zbog željezničke veze s lukom u Rijeci, cestovne povezanosti s unutrašnjosti Hrvatske (ceste Karolina, Jozefina i Lujzijana), dovoljne količine vode za tvorničke procese i raspoloživosti jeftine radne snage obližnjeg područja (Povijest hrvatske industrije 2020). Dvije godine kasnije zbog potrebe za električnom strujom izgrađen je turbinski pogon te je reguliran tok Mrežnice (Povijest hrvatske industrije 2020). Proizvodnja se bazirala na preradi pamuka te bijeljenju i bojenju pređe. Za vrijeme oba svjetska

rata proizvodio se materijal potreban vojsci (na primjer vojničko rublje, zavoji, platno za šatore, medicinska vata i sl.). Na vrhuncu uspješnosti 1984. godine, u tvornici je bilo zaposleno skoro 5000 ljudi. Tkalačka industrija činila je osnovu razvoja Duge Rese te je utjecala i na urbanistički razvoj grada. Za potrebe radnika izgrađeni su stanovi, kuće te bolnica, industrijsko-tekstilna škola i trgovina. Poduzeće se brinulo i za uličnu rasvjetu i kanalizaciju grada. Godine 2002. zbog nelikvidnosti i izmijenjenih gospodarskih uvjeta pokrenut je stečajni postupak i poduzeće je ugašeno 2015. godine (Povijest hrvatske industrije 2020). Djelatnosti koje danas prevladavaju u tom području su poljodjelstvo, stočarstvo, proizvodnja pokućstva, municije i obuće te turizam (Duga Resa. Hrvatska enciklopedija 2021).

3.4. Istraživane lokacije

Istraživanje je obuhvaćalo dvije lokacije na rijeci Mrežnici: uzvodnu referentnu postaju (REF) i nizvodnu onečišćenu postaju ispred nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi (DRT). Referentnu postaju, koja je udaljena oko 1,5 km uzvodno od onečišćene postaje, obilježava obilje makrofita, bistra voda i nejednako raspoređena šuma (Slike 5 i 6), ali i antropološki objekti kao betonska rampa za prilaz invalidskih kolica vodi, vezani kajaci i privatni molovi. Referentnu lokaciju okružuju kuće i objekti naselja Mrežnička Varoš te kultivirana polja njegovih stanovnika.



Slika 5. Prikaz referentne postaje (REF) uz makrofite i šumu na obali rijeke Mrežnice. Snimljeno 22. rujna 2021. Autorica fotografije: Marita Cvitanović.



Slika 6. Prikaz referentne postaje (REF) na rijeci Mrežnici. Vidljive su kopnena i vodena vegetacija te smještaj objekata naselja Mrežnička Varoš u neposrednoj blizini vode. Snimljeno 22. rujna 2021. Autorica fotografije: Marita Cvitanović.



Slika 7. Prikaz postaje Duga Resa – tvornica tekstila (DRT). Uz tvornicu je vidljiva vegetacija rijeke Mrežnice. Snimljeno 23. rujna 2021. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.



Slika 8. Prikaz obale Mrežnice s vegetacijom te istraživača u izlovu riba elektroagregatom. U pozadini se nalazi nekadašnja tvornica tekstila u Dugoj Resi, a s desne strane vrh susjedne brane. Snimljeno 23. rujna 2021. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun

Uzorkovanje na onečišćenoj postaji u Dugoj Resi ispred nekadašnje tvornice tekstila (Slike 7 i 8). Tvornica se nalazi na obali uz samu rijeku i pored nje je omanja brana, dio hidroelektrane izgrađene za potrebe tvornice (Slika 8). Okolni prostor sličan je onome na referentnoj postaji, samo s manje poljoprivrednih površina i velikim prostorom koji zauzima tvornica.

Tablica 1. Koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u finoj frakciji sedimenta (< 2 mm) rijeke Mrežnice na dvjema postajama, referentnoj uzvodno od Duge Rese i onečišćenoj ispred nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi, u proljeće 2020. godine (Čerkez, 2021; Dragun i sur 2021, 2022b).

	Referentna postaja (REF)	Duga Resa – tvornica (DRT)	Omjer DRT/REF
As / mg kg⁻¹	4,81±0.40	4,30±0,32	0,89
Bi / mg kg⁻¹	0,044±0,003	0,152±0,004	3,45
Cd / mg kg⁻¹	0,710±0,074	0,492±0,031	0,69
Co / mg kg⁻¹	3,68±0,22	5,83±0,06	1,58
Cs / mg kg⁻¹	0,549±0,038	2,54±0,06	4,63
Cu / mg kg⁻¹	7,16±1,73	15,9±0,7	2,22
Fe / g kg⁻¹	7,22±0,62	12,3±0,2	1,70
Mn / mg kg⁻¹	405±24	286±5	0,71
Mo / mg kg⁻¹	0,253±0,047	0,905±0,026	3,58
Rb / mg kg⁻¹	6,71±0,41	31,9±0,9	4,75
Tl / mg kg⁻¹	0,191±0,010	0,446±0,006	2,34
V / mg kg⁻¹	17,3±1,2	47,6±0,8	2,75
Zn / mg kg⁻¹	46,0±13,7	59,6±11,2	1,30
Ca / g kg⁻¹	368±21	265±4	0,72
K / mg kg⁻¹	823±32	3871±244	4,70
Mg / g kg⁻¹	2,36±0,12	4,99±0,11	2,11
Na / mg kg⁻¹	326±16	975±39	2,99

Prema nedavnim istraživanjima, vidljivo je blago povećanje onečišćenja rijeke Mrežnice u neposrednoj blizini nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi u odnosu na uzvodnu referentnu postaju (Tablica 1; Čerkez 2021; Dragun i sur. 2021, 2022b). Ispred tvornice zabilježene su povišene koncentracije većeg broja elemenata u tragovima (Bi, Co, Cs, Cu, Fe, Mo, Rb, Tl, V, Zn), kao i makroelemenata (K, Mg, Na) u sedimentu u odnosu na referentnu postaju. Razlike u koncentracijama otopljenih elemenata u vodi između dviju postaja bile su puno manje izražene, s tek nešto povišenim razinama Cu i Fe ispred tvornice. No, i na referentnoj postaji zabilježene su povišene koncentracije nekoliko elemenata u sedimentima u odnosu na postaju kod tvornice, i to As, Cd, Mn i Ca, kao pokazatelj blagog utjecaja poljoprivrednih aktivnosti na kakvoću riječne vode.

Uzorkovanje riba na referentnoj postaji (REF) obavljeno je 23. travnja 2021., a na postaji Duga Resa – tvornica (DRT) 22. travnja 2021. godine. Uzorkovanje je ponovljeno na objema postajama 1. svibnja 2021. godine.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Terenski rad - uzorkovanje štika

Prvi dio istraživanja obuhvaćao je terenski rad. Na opisanim lokacijama na rijeci Mrežnici provedeno je uzorkovanje štika (*E. lucius*) elektroagregatom Hans Grassl (EL63 II GI, 5.0 KW, 137 Honda GX270, 300/600V max., 27/15A max.) i uz uporabu gumenog čamca (Slika 9). Terenski rad obavljen je u suradnji s djelatnicima Laboratorija za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković i Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u skladu sa standardom HRN EN 14011 (2005) (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) te prema metodologiji opisanoj detaljnije u radu Dragun i sur. (2020). Ulovljene su ukupno 33 jedinke, na referentnoj postaji 16 te na onečišćenoj postaji 17 jedinki.



Slika 9. Prikaz terenskog tima na gumenom čamcu prije početka izlova štika u jesenskom razdoblju 2021. godine. Snimljeno 22. rujna 2021. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.

Na mjestu izlova, neposredno nakon uzorkovanja (Slika 10), štuke su anestetizirane trikain metan sulfonatom (MS 222, Sigma Aldrich) u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 55/2013). Određeni su i izračunati biometrijski parametri: masa i dužina (Slika 11) te Fultonov kondicijski indeks, spol i boja jetri (Slike 12 i 13). Fultonov kondicijski indeks (FCI) predstavlja omjer mase i dužine. Formula za njegovo izračunavanje je sljedeća:

$$FCI = (m \times 100) / d^3$$

gdje *FCI* označava Fultonov kondicijski indeks, *m* predstavlja ukupnu masu štuke u gramima, a *d* standardnu dužinu štuke u centimetrima. Makroskopskim pregledom gonada određen je spol štuka. Potom su sekcijom izdvojeni uzorci jetri, koji su odmah pohranjeni u tekući dušik te naknadno u zamrzivač na -80 °C.



Slika 10. Štuke neposredno nakon izlova. Snimljeno 1. svibnja 2021. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.



Slika 11. Mjerenje dužine štuke na terenu. Snimljeno 22. svibnja 2020. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.



Slika 12. Uzorkovana jedinka sa zelenom jetrom. Snimljeno 22. travnja 2021. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.

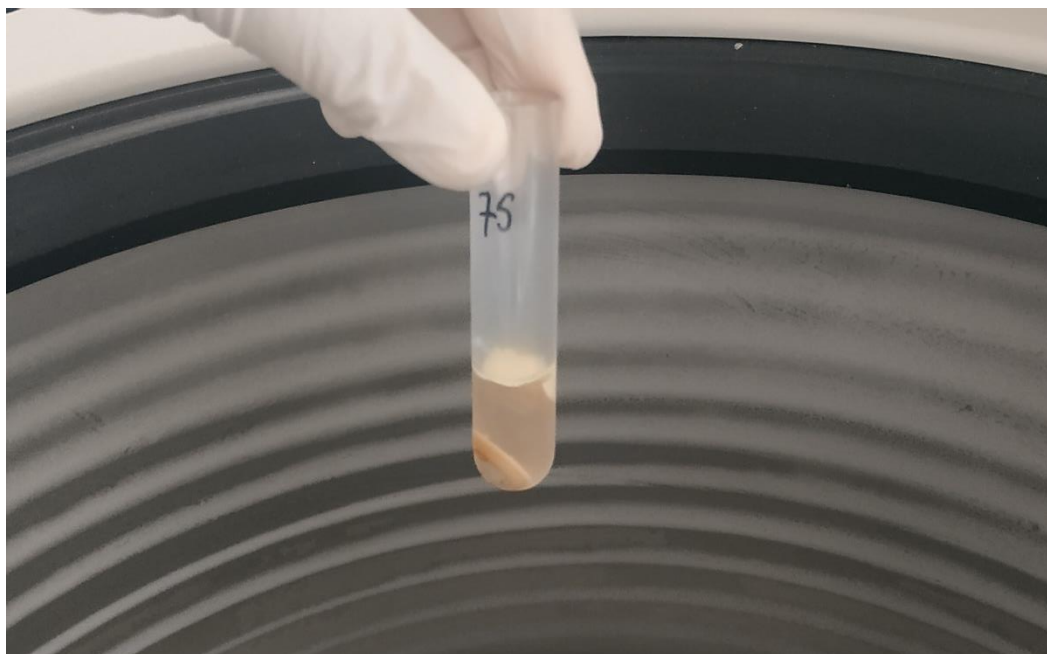


Slika 13. Uzorkovana jedinka sa žuto-smeđom jetrom. Snimljeno 8. lipnja 2020. Autorica fotografije: dr. sc. Zrinka Dragun.

4.2. Laboratorijski rad - priprema jetrenih homogenata i izolacija citosolskih frakcija

Laboratorijski rad započela sam homogenizacijom jetrenog tkiva štika i izolacijom citosolskih frakcija. Jetre sam izrezala na male dijelove te im dodala ohlađeni homogenizacijski pufer (100 mM Tris/Base (Sigma, pH 8,1 na 4 °C) obogaćen reducentsom 1 mM ditiotreitolum (Sigma)) ($\text{masa}_{\text{tkiva}}/\text{volumen}_{\text{pufera}} 1:5$). Tako dobivenu suspenziju homogenizirala sam pomoću deset poteza homogenizatorom Potter-Elvehjem (Glas-Col, SAD) na ledu pri 6.000 okretaja u minuti. Alikvote homogenata (dva puta po 300 μL) odvojila sam za analize ukupnih koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata u jetri. Ostatak homogenata centrifugirala sam na 50.000 \times g 120 min pri +4 °C. Po završenom centrifugiranju prebacila sam supernatante (S50) pomoću Pasteurovih pipeta u plastične epruvete te zatim u Eppendorf epruvete (1,5 mL) te sam ih smrznula na -80 °C. Supernatant S50 predstavlja topljivu tkivnu frakciju, odnosno citosol. Cijeli se postupak odvijao na ledu ili uz hlađenje, kako bi se očuvala

fiziološka raspodjela elemenata u tragovima i makroelemenata u stanicama jetrenog tkiva (Dragun i sur. 2020). Uzorak jetrenog homogenata nakon centrifugiranja prikazan je na Slici 14.



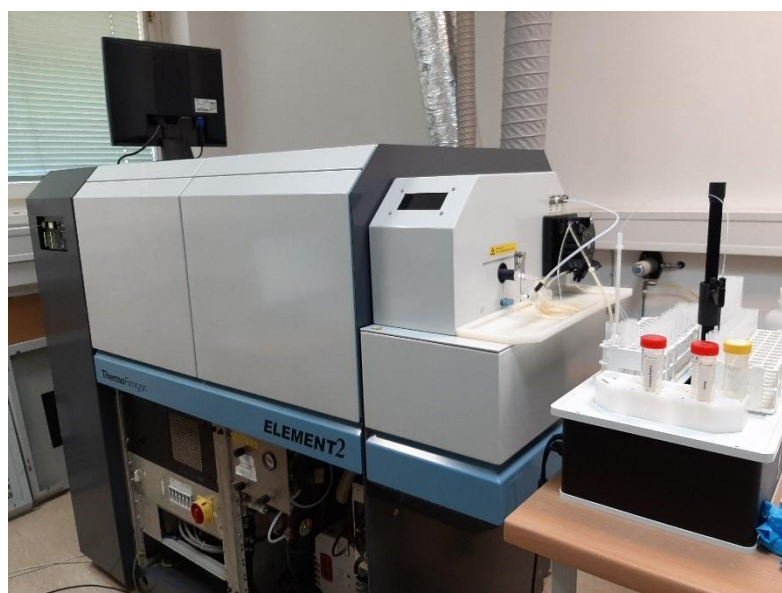
Slika 14. Uzorak jetrenog homogenata nakon dva sata centrifugiranja na $50.000\times g$ i pri $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Snimljeno 6. listopada 2021. Autorica fotografije: Marita Cvitanović.

4.3. Laboratorijski rad - razgradnja homogenata i citosola

Homogenate i citosolske frakcije bilo je potrebno razgraditi prije mjerenja. Homogenate sam razgradila u smjesi nitratne kiseline (HNO_3 za analizu elemenata u tragovima, Normatom, 67-69%, VWR Chemicals, UK) i 30% vodikovog peroksida (H_2O_2 , *Suprapur*, Merck, Njemačka) u omjeru volumena $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1. Navedenu oksidacijsku smjesu homogenatu sam dodala u omjeru 3:1. Citosolske frakcije sam razgradila pomoću iste smjese HNO_3 i H_2O_2 u omjeru $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1, ali je omjer oksidacijske smjese i citosola iznosio 1:1. Slijedilo je grijanje u sušioniku u trajanju 3,5 h pri $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ te potom hlađenje na sobnu temperaturu. Tako dobivene otopine razrijedila sam pet puta Milli-Q vodom za mjerenje koncentracija elemenata u tragovima (kako bi se koncentracija kiseline spustila ispod 10%) te dvadeset puta za mjerenje koncentracija makroelemenata. Sve uzorke sam za mjerenja pripremila u duplikatu.

4.4. Odabrana metoda određivanja koncentracija metala i metaloida

Postoje razne metode za mjerenje metala, a najvažnije je da instrument ima visoku osjetljivost kako bi mogao detektirati niske koncentracije metala uz što manju pogrešku. Neki od primjera takvih metoda su atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS – grafitna i plamena tehnika), atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES) i spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) (Lobinski i Marczenko 1997; Csuros i Csuros 2002).



Slika 15. Prikaz instrumenta za mjerenje koncentracija metala i metaloida: spektrometar masa visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS Element 2, Thermo Finnigan, Njemačka). Autorica fotografije: dr. sc. Dušica Ivanković.

Za okolišna istraživanja u kojima se istovremeno analizira veći broj metala pogodan instrument je ICP-MS koji ima izrazito nisku granicu detekcije, široki raspon linearnosti te mogućnost istovremenog mjerenja više elemenata te posebno ICP-MS visoke rezolucije (HR ICP-MS) zbog manje pojave interferencija pri mjerenju (Slika 15). Pri upotrebi toga instrumenta, pripremljeni se uzorak u obliku otopine prenosi do nebulizatora ili raspršivača (na

primjer, pomoću peristaltičke pumpe) te se uzorak pomoću struje argona pretvara u kapljice različitih veličina (aerosol). Aerosol se u komori za raspršivanje razdvaja po veličini kapljica te se najmanje kapljice injektiraju u plazmu. Plazma je visoko ionizirajući plin (najčešće argon) koji provodi električnu energiju i podliježe utjecaju magnetskog polja, a uzrokuje uklanjanje vode, vaporizaciju (pretvorbu aerosola u plin), atomizaciju i ionizaciju elemenata u uzorku. Argonska plazma je stabilna, a k tome osigurava i smanjenje kemijskih i fizikalnih interferencija, kao i vrlo učinkovitu ionizaciju velikog broja elemenata čime omogućava multielementnu analizu, odnosno istovremeno mjerenje velikog broja elemenata. Usmjeravanje i fokusiranje iona prema analizatoru i detektoru u spektrometru masa obavlja elektronički sustav leća, dok ih analizator razdvaja po omjeru masa/naboj, a detektor ih bilježi. Čestice koje se nisu ionizirale u plazmi uklanjaju se vakuum pumpom. Krajnje rezultate bilježi detektor te se prikazuju na računalo koje je povezano s HR ICP-MS uređajem. Rezultati su grafički prikazani u obliku pikova te brojčano u obliku intenziteta, iz kojih se pomoću kalibracijskih pravaca izračunava koncentracija svakog pojedinog elementa u uzorku (Dautović 2006).

4.5. Laboratorijski rad – mjerenje koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata

Koncentracije makroelemenata (Na, K, Ca, Mg) i elemenata u tragovima (Ag, As, Bi, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Mn, Mo, Rb, Se, Tl, V, Zn) izmjerila sam pomoću spektrometra masa visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS Element 2, Thermo Finnigan, Njemačka) s automatskim uzorkivačem SC-2 DX FAST (Element Scientific, SAD), SeaSpray nebulizatorom i Twister komorom za raspršivanje. Provela sam vanjsku kalibraciju pomoću niza razrijeđenja multielementne standardne otopine za elemente u tragovima (Analitika, Republika Češka) u koju su dodani standardi Rb (Sigma-Aldrich, Njemačka) i Cs (Fluka, Njemačka), standardne otopine Ag (Fluka, Njemačka) te multielementne standardne otopine za makroelemente (Fluka, Njemačka), pripremljenih u 2% (volumno) nitratnoj kiselini (Normatom, 67-69% za analizu elemenata u tragovima, VWR Chemicals, UK) (prema Dragun i sur. 2018). Svim uzorcima i kalibracijskim standardima dodala sam indij (Fluka, Njemačka) kao interni standard ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) (Fiket i sur. 2007; Dragun i sur. 2020). Mjerenja sam provela na

tri rezolucije: ^{82}Se , ^{85}Rb , ^{98}Mo , ^{109}Ag , ^{111}Cd , ^{133}Cs i ^{205}Tl mjerila sam na niskoj, ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{42}Ca , ^{51}V , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{66}Zn i ^{86}Sr na srednjoj te ^{39}K i ^{75}As na visokoj rezoluciji.

Za pouzdano mjerenje koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata potrebno je odrediti njihove najniže koncentracije koje možemo sa sigurnošću detektirati u uzorcima homogenata i citosola jetri, odnosno njihove granice detekcije (GD). Za tu svrhu koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata izmjerene su deset puta uzastopno u slijepoj probi (Tris-HCl/Base pufer, ditiotreitol) koja je prethodno bila obrađena istom procedurom kao i uzorci homogenata i citosola, odnosno nakon njene razgradnje u nitratnoj kiselini i vodikovom peroksidu. Granice detekcije (Tablice 2 i 3) izračunate su množenjem standardnih devijacija tako dobivenih rezultata mjerenja brojem tri.

Kontrola točnosti mjerenja na HR ICP-MS-u provedena je analizom odabranih elemenata u tragovima i makroelemenata u kontrolnim uzorcima (UNEP/GEMS, Kanada). Dobiveni su sljedeći rezultati točnosti mjerenja: As, $103,3 \pm 4,3\%$; Ca, $98,9 \pm 1,8\%$; Cd, $102,5 \pm 0,8\%$; Co, $105,7 \pm 0,2\%$; Cu, $103,7 \pm 1,5\%$; Fe, $97,8 \pm 2,8\%$; K, $102,5 \pm 0,1\%$; Mg, $103,3 \pm 3,0\%$; Mn, $104,7 \pm 1,3\%$; Mo, $100,2 \pm 0,5\%$; Na, $103,9 \pm 0,6\%$; Zn, $109,5 \pm 1,0\%$.

Tablica 2. Prikaz granica detekcije (GD) elemenata u tragovima za citosole i homogenate jetrenog tkiva štuke (*Esox lucius*).

	GD / citosoli	GD / homogenati
Ag / ng g⁻¹	0,369	0,469
As / ng g⁻¹	1,40	1,60
Bi / ng g⁻¹	0,241	0,322
Cd / ng g⁻¹	0,080	0,441
Co / ng g⁻¹	0,220	0,469
Cs / ng g⁻¹	0,099	0,001
Cu / ng g⁻¹	16,3	4,68
Fe / ng g⁻¹	75,2	61,2
Mn / ng g⁻¹	1,70	3,84
Mo / ng g⁻¹	0,205	3,42
Rb / ng g⁻¹	1,60	0,301
Se / ng g⁻¹	1,53	5,17
Tl / ng g⁻¹	0,001	0,001
V / ng g⁻¹	0,151	0,197
Zn / ng g⁻¹	22,9	160

Tablica 3. Prikaz granica detekcije (GD) makroelemenata za citosole i homogenate jetrenog tkiva štuke (*Esox lucius*).

	GD / citosoli	GD / homogenati
Ca / ng g⁻¹	909	952
Na / ng g⁻¹	2027	1289
Mg / ng g⁻¹	633	407
K / ng g⁻¹	2194	1774

4.6. Obrada i statistička analiza rezultata

Sve izračune izvela sam u programu Microsoft Excel. Za crtanje grafova i statističke analize koristila sam program SigmaPlot 11.0 za Windowse. Za usporedbu rezultata dobivenih na dvjema postajama (biometrijski pokazatelji, koncentracije ukupnih i citosolskih elemenata, postotna zastupljenost elemenata u citosolu), kao i za usporedbu citosolskih koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata između dvaju spolova te između jetara različitih boja, koristila sam Mann-Whitney Rank Sum test. Za izračunavanje korelacije između ukupne koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u jetrama štika i njihove postotne zastupljenosti u citosolskoj frakciji, kao i korelacije između citosolskih koncentracija analiziranih elemenata i mase, odnosno dužine riba, koristila sam Spearmanov korelacijski koeficijent, odnosno Spearman Rank Order test. Kao statistički značajne razlike i statistički značajne korelacije označila sam one za koje je p vrijednost bila manja od 0,05. Koristila sam neparametrijske statističke testove zbog malog broja uzoraka, kao i zbog toga što distribucija podataka nije uvijek bila normalna.

5. REZULTATI

5.1. Biometrijski pokazatelji štika iz rijeke Mrežnice

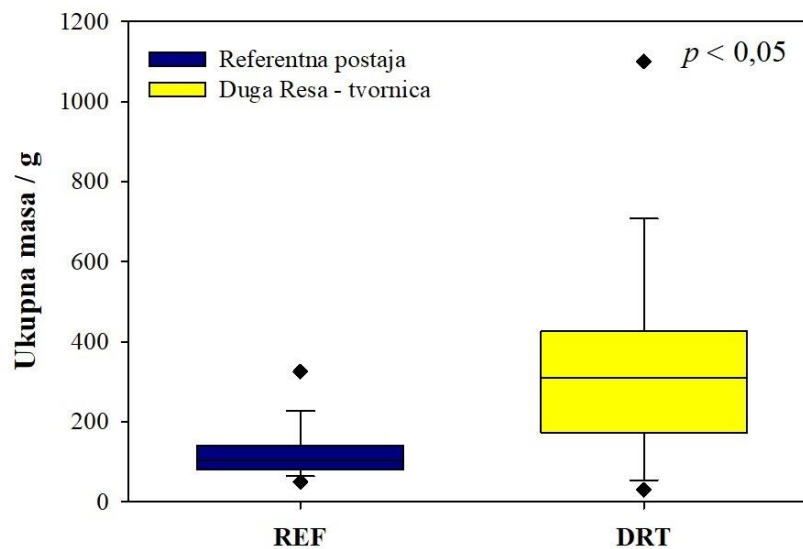
Metodom lova uz pomoć elektroagregata na rijeci Mrežnici uhvaćene su ukupno 33 štuke, 16 na uzvodnoj, odnosno referentnoj postaji (REF), i 17 na postaji Duga Resa-tvornica (DRT). Štuke s postaje DRT bile su statistički značajno teže (Slika 16, Tablica 4) i duže (Slika 17, Tablica 4) u odnosu na štuke s postaje REF. Fultonov kondicijski indeks bio je malo povišen kod štika s postaje REF (Slika 18, Tablica 4), no razlika nije bila statistički značajna.

Tablica 4. Usporedba biometrijskih pokazatelja štika (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese i onečišćenoj ispred tvornice u Dugoj Resi, u travnju/svibnju 2021. godine. Kvantitativni rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, s medijanom u zagradi. Podaci o spolu i boji jetara prikazani su kao omjeri mužjaka i ženki (M/Ž), odnosno štika sa zelenim i žutim jetrama (Z/Ž).

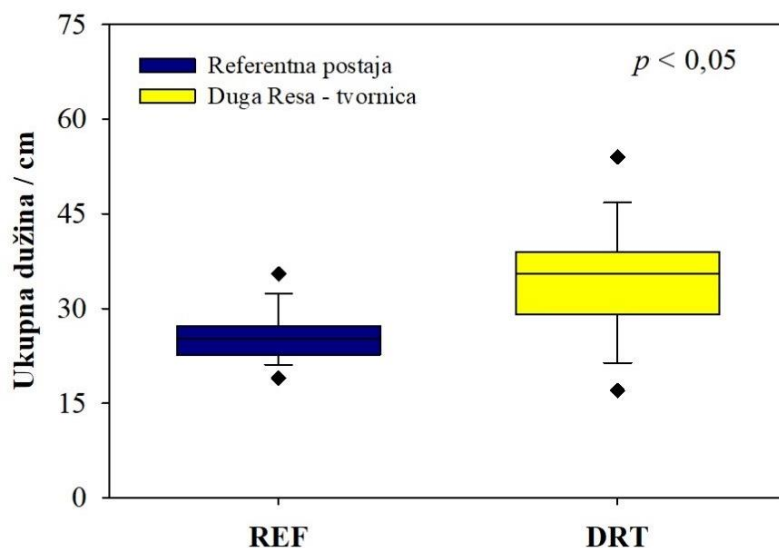
	Referentna postaja (REF)	Duga Resa – tvornica (DRT)
n	16	17
Ukupna dužina / cm	25,3±4,0 (25,3)*	34,7±9,0 (35,5)*
Ukupna masa / g	120±65,9 (103)*	343±258 (310)*
FCI / %	0,989±0,144 (0,942)	0,927±0,092 (0,929)
Spol (M/Ž)	12/2	9/7
Boja jetara (Z/Ž)	7/9	4/13

*Mann-Whitney Rank Sum testom utvrđena je statistički značajna razlika između postaja ($p < 0,050$).

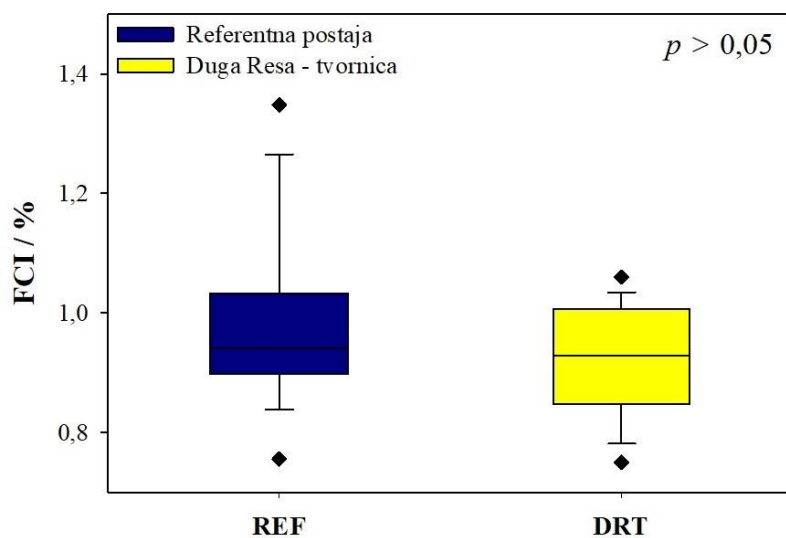
Na postaji REF uhvaćene su samo dvije ženke te 12 mužjaka, dok dvjema štukama nismo uspjeli utvrditi spol. Omjer spolova na postaji Duga Resa bio je ujednačeniji, s devet mužjaka i sedam ženki, a samo jednoj štuki nismo uspjeli utvrditi spol. Izvjestan udio štuka na objema postajama imao je jetre izrazito zelene boje, dok je uobičajena boja jetre kod štuke žućkasto-smeđa. Na postaji REF broj riba sa zelenim jetrama bio je 7, odnosno 44% ulovljenih štuka, dok je na postaji DRT taj udio bio tek 24%, odnosno četiri štuke (Tablica 1). Štuke sa zelenim jetrama bile su uglavnom vrlo male (većinom ispod 150 g), što je i razlog veće zastupljenosti na postaji REF.



Slika 16. Usporedba ukupne mase uzorkovanih jedinki štuka (*Esox lucius*) na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenoj ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku).



Slika 17. Usporedba ukupne dužine uzorkovanih jedinki štika (*Esox lucius*) na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenju ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku).



Slika 18. Usporedba Fultonovog kondicijskog indeksa uzorkovanih jedinki štika (*Esox lucius*) na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenju ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p > 0,05$ označava izostanak statistički značajne razlike).

5.2. Ukupne i citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelementa u jetri štika iz rijeke Mrežnice

Ukupne koncentracije 15 elemenata u tragovima i četiri makroelementa dobivene su na temelju mjerenja HR ICP-MS-om u razgrađenim jetrenim homogenatima, dok su citosolske koncentracije tih elemenata, odnosno koncentracije u topljivoj tkivnoj frakciji, dobivene mjerenjem u razgrađenim S50 supernatantima. Ukupne koncentracije 15 elemenata u tragovima prikazane su u Tablici 5, a četiri makroelementa u Tablici 6. Citosolske koncentracije prikazane su i tabelarno (Tablice 5 i 6) i grafički (Slike 19-21).

Ukupne koncentracije 19 analiziranih elemenata u jetrama štika javljale su se u sljedećem opadajućem nizu: K>Na>Mg>Fe>Ca>Zn>Cu,Rb>Mn>Se>Mo>Ag,As,Co>Tl,V>Cd>Bi,Cs.

U sličnom opadajućem nizu javljale su se i citosolske koncentracije 19 analiziranih elemenata u jetrama štika:

K>Na>Mg>Fe> Zn>Ca>Cu,Rb>Mn>Se>Mo>Ag>As>Co>V>Bi>Tl,Cd> Cs.

Usporedbom koncentracija 19 elemenata prikazanih u Tablicama 5 i 6 te na Slikama 19-21, možemo prepoznati prostorne trendove, odnosno razlike između dviju postaja uzorkovanja. Na onečišćenoj postaji DRT, utvrđene su povišene koncentracije nekoliko elemenata (ukupne i citosolske), i to Bi, Cs, Cu, Fe, Se i Zn. Razlike između postaja bile su statistički značajne, kako za ukupne tako i za citosolske koncentracije Bi, Cs, Cu i Fe te za citosolske koncentracije Se. Najizraženija je bila razlika za Bi i Fe, koji su na DRT postaji bili otprilike 2,5-3,5 puta viši u jetrama štika u odnosu na REF postaju, dok su razlike za ostale elemente bile puno manje (60-90% više vrijednosti za Cs i Cu te samo 10-20% za Se i Zn).

No, nekoliko je elemenata bilo nađeno u povišenim koncentracijama (ukupnim i citosolskim) i na postaji REF, i to Mn, Mo i Tl, a razlike između postaja bile su statistički značajne u slučaju Mn i Tl i za ukupne i citosolske koncentracije te u slučaju Mo samo za ukupne koncentracije. Ova su povišenja, međutim, bila znatno manje izražena nego povišenja na DRT postaji te su koncentracije Mn i Tl bile oko 40% više u jetrama štika na REF postaji, a Mo samo oko 15%. Ostali elementi u tragovima, Ag, As, Cd, Co, Rb i V, te sva četiri makroelementa (Ca, K, Mg i Na) zabilježeni su u približno jednakim koncentracijama (ukupnim i citosolskim) u jetrama štika uzorkovanih na objema postajama.

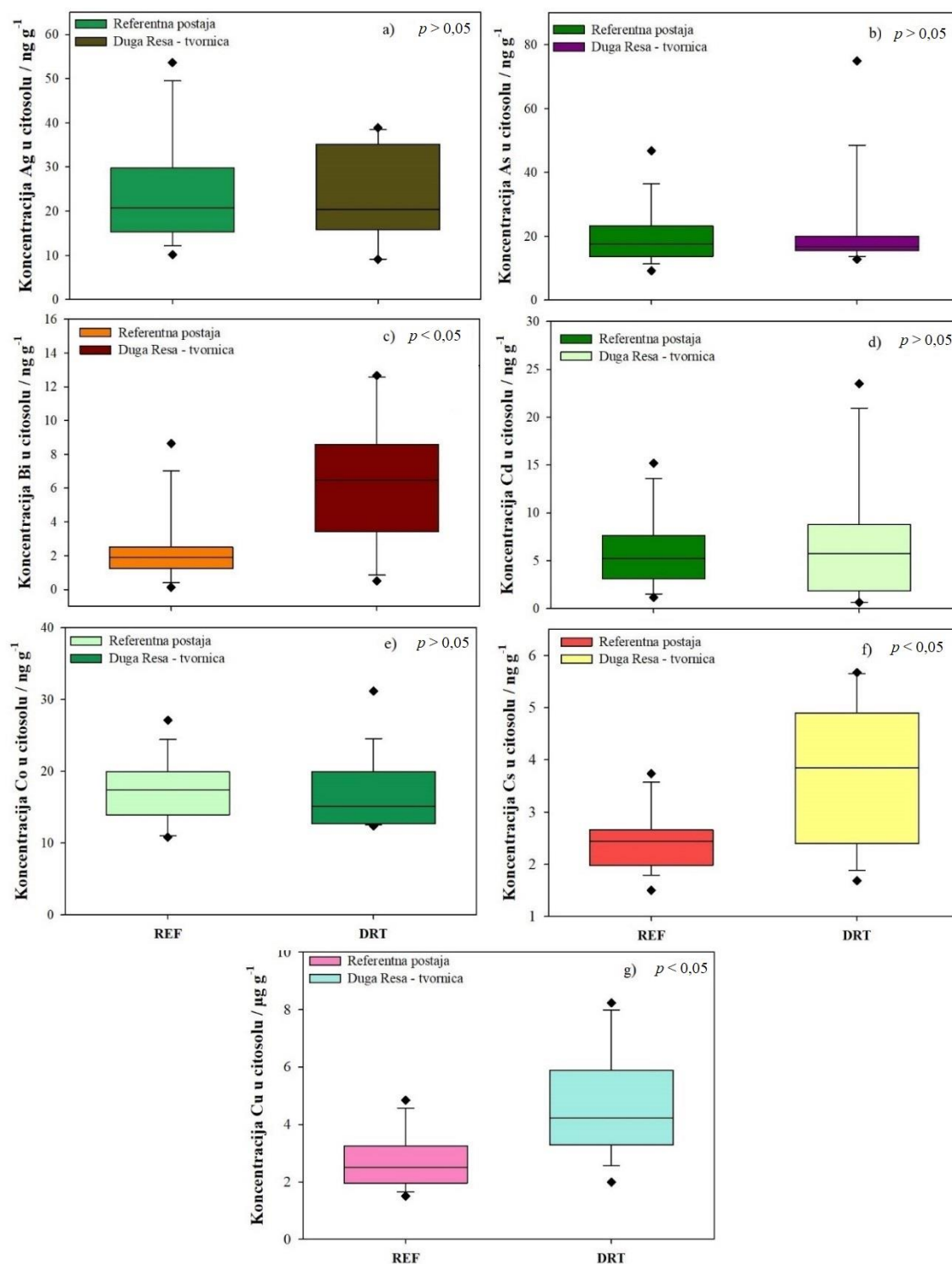
Tablica 5. Ukupne i citosolske koncentracije elemenata u tragovima izmjerene u jetrama štika (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenju ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, s medijanom u zagradi.

	Ukupne koncentracije elemenata		Citosolske koncentracije elemenata	
	REF	DRT	REF	DRT
n	16	17	16	16
Ag / ng g⁻¹	28,9±13,6 (25,5)	28,1±11,4 (23,9)	24,6±12,4 (20,8)	23,7±10,3 (20,4)
As / ng g⁻¹	25,3±7,8 (25,6)	30,8±20,7 (23,6)	20,0±9,1 (17,6)	22,6±15,6 (16,7)
Bi / ng g⁻¹	2,41±1,86 (1,75)*	5,39±3,33 (4,80)*	2,53±2,30 (1,90)*	6,41±3,63 (6,48)*
Cd / ng g⁻¹	7,90±4,96 (7,35)	8,08±8,04 (4,98)	6,24±4,20 (5,24)	6,77±6,48 (5,75)
Co / ng g⁻¹	26,0±6,14 (25,4)	24,5±6,2 (24,3)	17,6±4,5 (17,4)	16,9±5,0 (15,2)
Cs / ng g⁻¹	2,72±0,66 (2,61)*	4,52±1,85 (4,88)*	2,45±0,58 (2,45)*	3,77±1,37 (3,84)*
Cu / µg g⁻¹	3,93±1,15 (3,65)*	6,45±2,43 (5,67)*	2,77±0,99 (2,50)*	4,73±1,80 (4,23)*
Fe / µg g⁻¹	68,5±57,3 (47,8)*	150±95 (134)*	25,3±24,6 (17,3)*	51,4±28,6 (44,9)*
Mn / ng g⁻¹	1537±398 (1542)*	1088±205 (1095)*	686±176 (707)*	498±87 (499)*
Mo / ng g⁻¹	169±42 (170)*	144±41 (145)*	81,0±19,4 (78,4)	73,9±18,1 (68,6)
Rb / µg g⁻¹	4,35±0,87 (4,19)	4,70±1,08 (4,46)	3,77±0,92 (3,68)	3,92±0,81 (3,76)
Se / ng g⁻¹	537±74 (549)	598±118 (565)	403±75 (413)*	497±120 (467)*
Tl / ng g⁻¹	22,2± 8,5 (20,2)*	16,0±3,5 (14,5)*	9,09±5,12 (7,79)*	5,75±1,04 (5,51)*
V / ng g⁻¹	23,3±20,9 (17,9)	25,2±17,1 (18,2)	15,1±13,5 (11,5)	14,9±9,4 (11,1)
Zn / µg g⁻¹	24,7±5,18 (23,2)	28,9±9,3 (26,6)	18,2±4,2 (17,3)	21,8±5,9 (20,8)

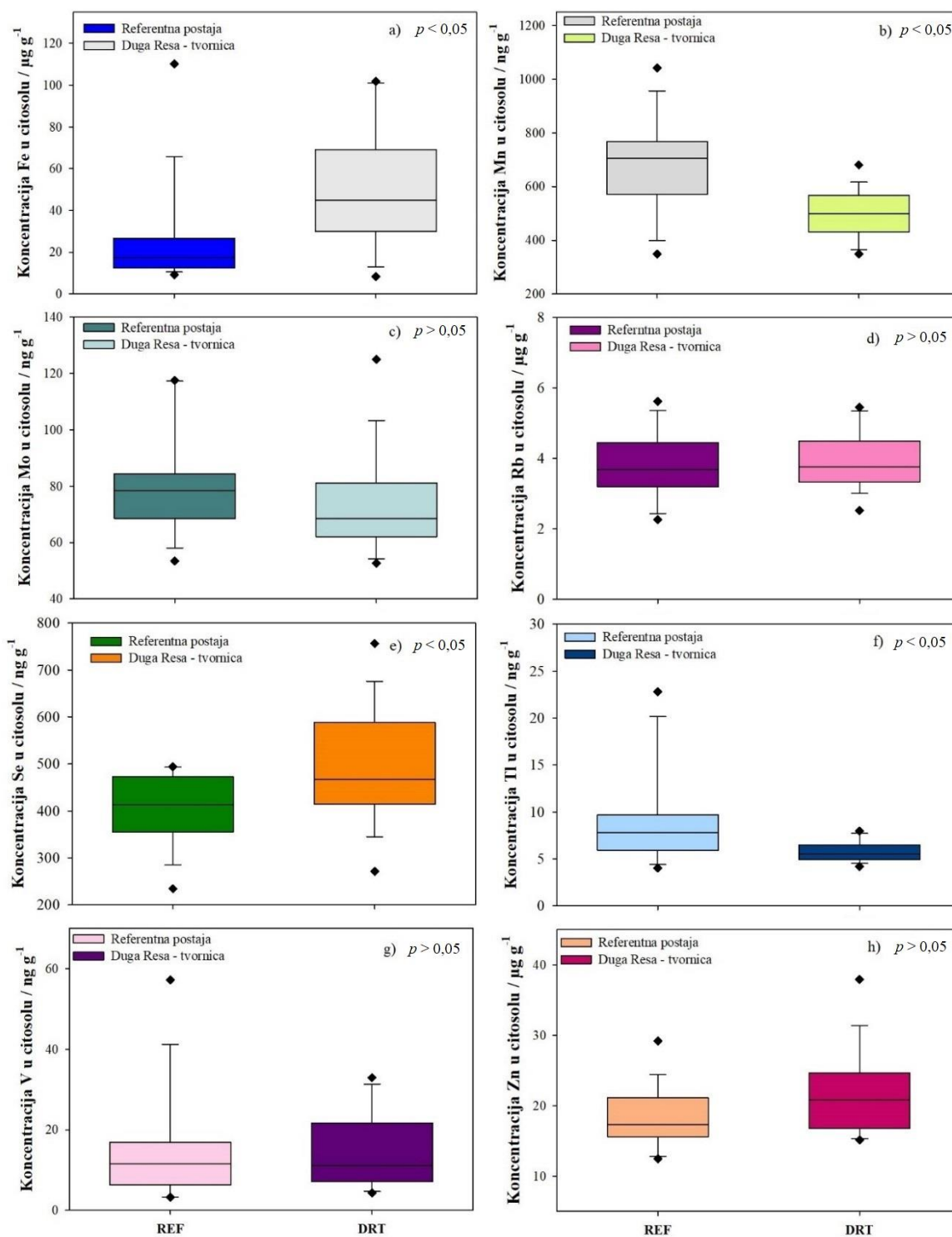
*Mann-Whitney Rank Sum testom utvrđena je statistički značajna razlika između postaja ($p < 0,050$).

Tablica 6. Ukupne i citosolske koncentracije makroelemenata izmjerene u jetrama štika (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenju ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, s medijanom u zagradi.

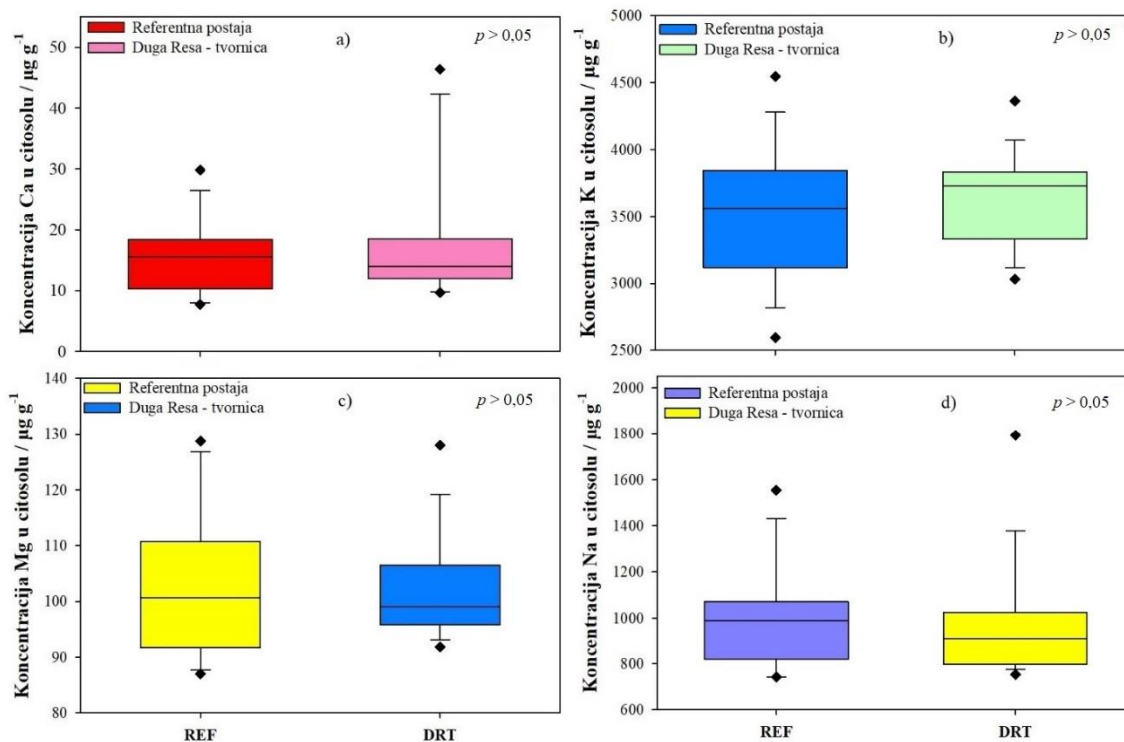
	Ukupne koncentracije elemenata		Citosolske koncentracije elemenata	
	REF	DRT	REF	DRT
n	16	17	16	16
Ca / $\mu\text{g g}^{-1}$	44,8±12,9 (42,6)	53,1±41,9 (39,7)	15,6±6,0 (15,6)	17,9±10,5 (14,0)
K / $\mu\text{g g}^{-1}$	3177±414 (3190)	3321±479 (3459)	3532±499 (3560)	3636±345 (3726)
Mg / $\mu\text{g g}^{-1}$	183±26 (187)	175±23 (171)	104±14 (101)	102±10 (99)
Na / $\mu\text{g g}^{-1}$	847±192 (805)	899±213 (842)	1000±225 (987)	973±252 (912)



Slika 19. Citosolske koncentracije elemenata u tragovima u jetrama štika (*Esox lucius*) iz rijeke Mrežnice uzorkovanih na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Broj jedinki: $n_{REF} = 16$, $n_{DRT} = 16$. Rezultati su prikazani redoslijedom: a) Ag, b) As, c) Bi, d) Cd, e) Co, f) Cs i g) Cu. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p < 0,05$ označava statistički značajne razlike).



Slika 20. Citosolske koncentracije elemenata u tragovima u jetrama štika (*Esox lucius*) iz rijeke Mrežnice uzorkovanih na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Broj jedinki $n_{\text{REF}} = 16$, $n_{\text{DRT}} = 16$. Rezultati su prikazani redosljedom: a) Fe, b) Mn, c) Mo, d) Rb, e) Se, f) Tl, g) V i h) Zn. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p < 0,05$ označava statistički značajne razlike).



Slika 21. Citosolske koncentracije makroelemenata u jetrama štuka (*Esox lucius*) iz rijeke Mrežnice uzorkovanih na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Broj jedinki $n_{\text{REF}} = 16$, $n_{\text{DRT}} = 16$. Rezultati su prikazani redosljedom: a) Ca, b) K, c) Mg i d) Na. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p > 0,05$ označava izostanak statistički značajnih razlika).

5.3. Zastupljenost elemenata u tragovima i makroelemenata u citosolskoj frakciji jetre štuke

Omjer citosolskih i ukupnih koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata pokazatelj je njihove zastupljenosti u topljivoj, citosolskoj frakciji jetre (Tablice 7 i 8), a izražava se u obliku postotka. Najveću zastupljenost u citosolu pronašli smo za Bi, Cs, K i Na na REF postaji te za Bi, K i Na na DRT postaji (> 90%). Nakon toga slijede Ag, As, Cd, Rb, Se i Zn na objema postajama te još Cs i Cu na postaji DRT sa zastupljenošću iznad 70%. Nešto manju zastupljenost, ali iznad 50% pronašli smo za Co, Cu, V i Mg na postaji REF te Co, Mo, V i Mg na postaji DRT. Najniža zastupljenost u citosolskoj frakciji zabilježena je za Fe, Mn, Mo, Tl i Ca na postaji REF, odnosno za Fe, Mn, Tl i Ca na DRT postaji (< 50%). Uočljivo je da se zastupljenost nekoliko elemenata malo razlikuje između postaja, a statistički značajne razlike su utvrđene za Bi, Cu, Mo i Se koji su na onečišćenoj postaji bili zastupljeni u citosolskoj frakciji u nešto većem postotku nego na referentnoj, dok je na referentnoj postaji veća zastupljenost bila zabilježena za Cs i Na u odnosu na DRT postaju.

Raspodjela između topljive i netopljive tkivne frakcije ovisi o afinitetu svakog pojedinog elementa. Neki elementi će nakon povišenog unosa biti pretežno raspodijeljeni u topljivu citosolsku frakciju, a drugi u granule, organele i druge netopljive stanične komponente. Izračunavanjem korelacije između postotne zastupljenosti elemenata u citosolu i ukupne koncentracije tih elemenata u jetrama štuka primjenom korelacijskog koeficijenta (Spearman Rank Order test; Tablice 7 i 8) utvrđeno je na koji se način mijenja zastupljenost pojedinog elementa u citosolu kao posljedica porasta ukupno akumulirane količine tog elementa. Za Bi i Cu dobivene su visoke (> 0,5) i statistički značajne pozitivne korelacije između ovih dviju varijabli, što je pokazivalo da s porastom ukupno akumuliranog Bi i Cu njihova zastupljenost raste u citosolskoj frakciji. Oba metala su nađena u višim postotcima u citosolu na DRT postaji gdje su utvrđene i povišene ukupne koncentracije ovih metala u jetrama štuka. Za Cs, Mo i Mg dobivene su visoke (> 0,5) i statistički značajne negativne korelacije između ovih dviju varijabli, što je pokazalo da s porastom ukupno akumuliranog Cs, Mo i Mg njihova zastupljenost u citosolskoj frakciji pada, odnosno povećani unos tih metala rezultira pohranom u netopljivoj tkivnoj frakciji. Sva tri elementa nađena su u višim postotcima u citosolu na onoj postaji gdje su utvrđene njihove niže ukupne koncentracije u jetrama štuka, a to je za Cs bila postaja REF, a za Mo i Mg postaja DRT.

Tablica 7. Postotna zastupljenost elemenata u tragovima u citosolskoj frakciji jetara štika (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenoj ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine (rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, s medijanom u zagradi), te analiza korelacije između ukupnih koncentracija elemenata u tragovima i njihovih postotnih udjela u citosolu (Spearmanov korelacijski koeficijent).

	Udio elemenata u citosolskoj frakciji		Korelacijski koeficijent (r)
	REF	DRT	REF + DRT
n	16	16	32
Ag / %	84,2±7,6 (84,5)	84,9±5,8 (85,3)	0,240
As / %	77,5±13,0 (77,1)	80,6±11,9 (82,2)	0,186
Bi / %	94,4±25,7 (99,2)*	112,4±22,3 (116,5)*	0,686 ⁺
Cd / %	77,2±8,9 (77,2)	86,5±25,9 (81,5)	0,067
Co / %	67,7±6,9 (66,2)	69,6±7,2 (68,8)	-0,033
Cs / %	90,5±7,0 (91,1)*	84,7±9,0 (82,7)*	-0,660 ⁺
Cu / %	69,8±7,7 (69,3)*	75,6±5,4 (76,2)*	0,495 ⁺
Fe / %	38,7±11,2 (38,8)	37,0±11,6 (40,3)	-0,352 ⁺
Mn / %	45,4±7,9 (46,3)	47,2±6,4 (47,7)	-0,257
Mo / %	48,3±5,5 (46,9)*	53,3±5,5 (52,4)*	-0,548 ⁺
Rb / %	86,1±7,1 (85,5)	83,7±7,6 (82,4)	-0,170
Se / %	74,7±8,4 (74,5)*	82,0±9,3 (81,7)*	0,165
Tl / %	40,0±10,2 (39,0)	37,7±7,4 (37,4)	-0,070
V / %	66,6±7,7 (65,1)	63,8±5,7 (63,4)	-0,382 ⁺
Zn / %	73,7±6,8 (75,2)	75,6±6,7 (75,7)	0,051

*Mann-Whitney Rank Sum testom utvrđena je statistički značajna razlika između postaja ($p < 0,050$).

⁺Statistički značajna korelacija prema Spearman Rank Order testu ($p < 0,050$).

Tablica 8. Postotna zastupljenost makroelemenata u citosolskoj frakciji jetara štika (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama na rijeci Mrežnici, referentnoj uzvodno od Duge Rese (REF) i onečišćenju ispred tvornice u Dugoj Resi (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine (rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, s medijanom u zagradi), te analiza korelacije između ukupnih koncentracija makroelemenata i njihovih postotnih udjela u citosolu (Spearmanov korelacijski koeficijent).

	Udio elemenata u citosolskoj frakciji		Korelacijski koeficijenti (r)
	REF	DRT	REF + DRT
n	16	16	32
Ca / %	34,5±7,6 (34,0)	36,8±9,1 (38,8)	-0,168
K / %	111,6±11,7 (108,5)	107,5±7,1 (107,9)	-0,478 ⁺
Mg / %	57,5±7,1 (57,4)	58,1±6,3 (59,1)	-0,634 ⁺
Na / %	118,6±12,1 (116,1)*	107,6±8,6 (105,9)*	-0,178

*Mann-Whitney Rank Sum testom utvrđena je statistički značajna razlika između postaja ($p < 0,050$).

⁺Statistički značajna korelacija prema Spearman Rank Order testu ($p < 0,050$).

5.4. Utjecaj fizioloških čimbenika na citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u jetrama štika

5.4.1. Utjecaj veličine kao fiziološkog čimbenika

Budući da se elementi prisutni u citosolu smatraju potencijalno raspoloživijima za toksično djelovanje, daljnje smo analize proveli na podacima za citosolsku frakciju jetara štika. Kako bismo utvrdili utječe li veličina štika na citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata, proveli smo korelacijsku analizu međusobne povezanosti mase, odnosno dužine štika i citosolskih koncentracija 19 elemenata u njihovim jetrama. Korelacijski koeficijenti su pomoću Spearman Rank Order testa izračunati samo za štuke s postaje DRT (Tablica 9 i 10), budući da su na toj postaji ulovljene jedinke šireg raspona veličina (Tablica 4). Na postaji REF sve su jedinke bile razmjerno male te unutar uskog raspona masa te nisu

mogle poslužiti za utvrđivanje povezanosti citosolskih koncentracija elemenata i veličine riba. Statistički značajna ($p < 0,050$) pozitivna korelacija utvrđena je za sljedeće elemente: Bi, Cs i Fe, dok je za Ca utvrđena statistički značajna negativna korelacija. Rezultati za ova četiri elementa prikazani su i grafički (Slike 22-25) te je vidljivo da su koncentracije Bi, Cs i Fe više u većih štuca, dok su koncentracije Ca više u manjih štuca.

Tablica 9. Analiza korelacija citosolskih koncentracija elemenata u tragovima (c_c) izmjerenih u jetrama štuca (*Esox lucius*) i mase (m), odnosno ukupne dužine (d), uzorkovanih jedinki (Spearmanov korelacijski koeficijent). Analiza je provedena za štuca uzorkovane u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici.

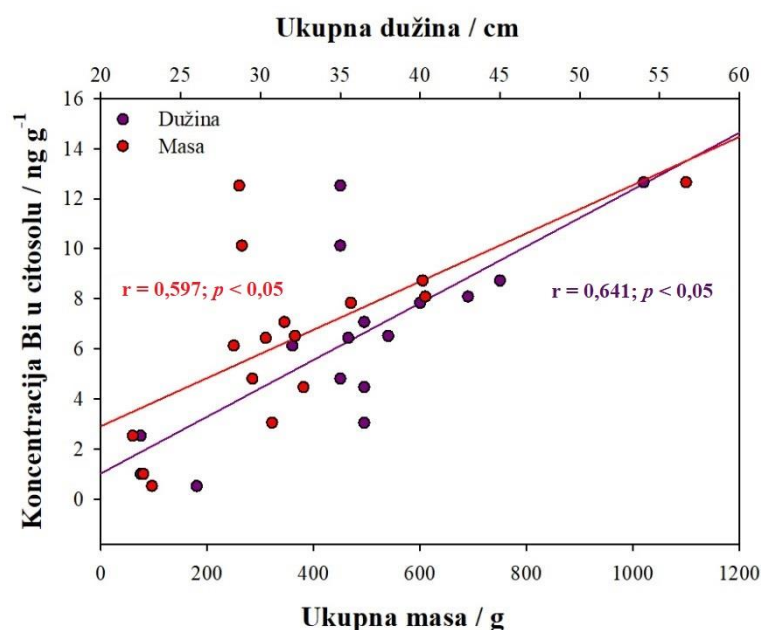
	Korelacijski koeficijent (c_c , m)	Korelacijski koeficijent (c_c , d)
n	16	16
Ag	-0,050	-0,081
As	-0,438	-0,453
Bi	0,597 ⁺	0,641 ⁺
Cd	0,077	0,095
Co	-0,209	-0,212
Cs	0,547 ⁺	0,543 ⁺
Cu	0,112	0,083
Fe	0,529 ⁺	0,552 ⁺
Mn	-0,453	-0,435
Mo	-0,385	-0,412
Rb	0,391	0,346
Se	0,241	0,228
Tl	-0,132	-0,142
V	0,065	0,098
Zn	0,027	-0,009

⁺Statistički značajna korelacija prema Spearman Rank Order testu ($p < 0,050$).

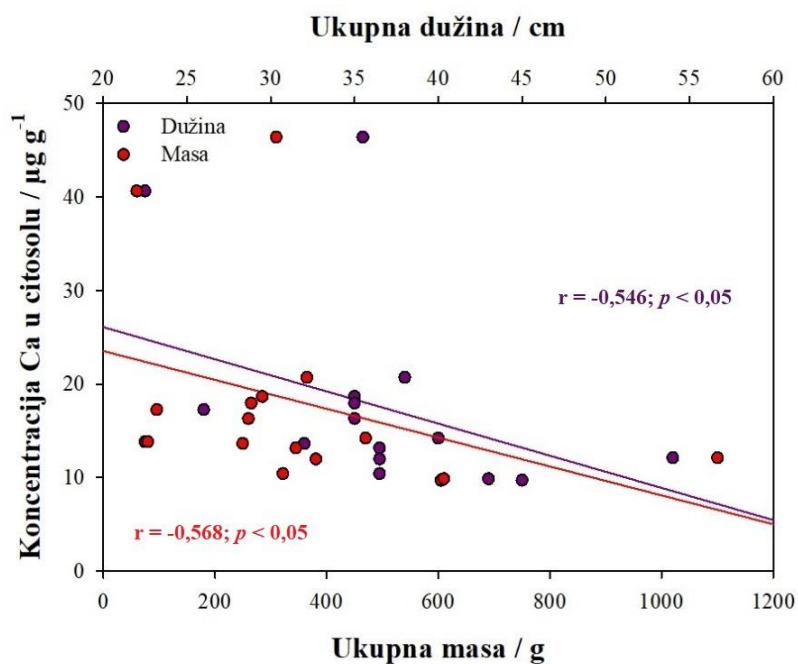
Tablica 10. Analiza korelacija citosolskih koncentracija makroelemenata (c_c) izmjerenih u jetrama štika (*Esox lucius*) i mase (m), odnosno ukupne dužine (d), uzorkovanih jedinki (Spearmanov korelacijski koeficijent). Analiza je provedena za štuke uzorkovane u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici.

	Korelacijski koeficijent (c_c , m)	Korelacijski koeficijent (c_c , d)
n	16	16
Ca	-0,568 ⁺	-0,546 ⁺
K	0,385	0,379
Mg	0,262	0,240
Na	0,003	0,002

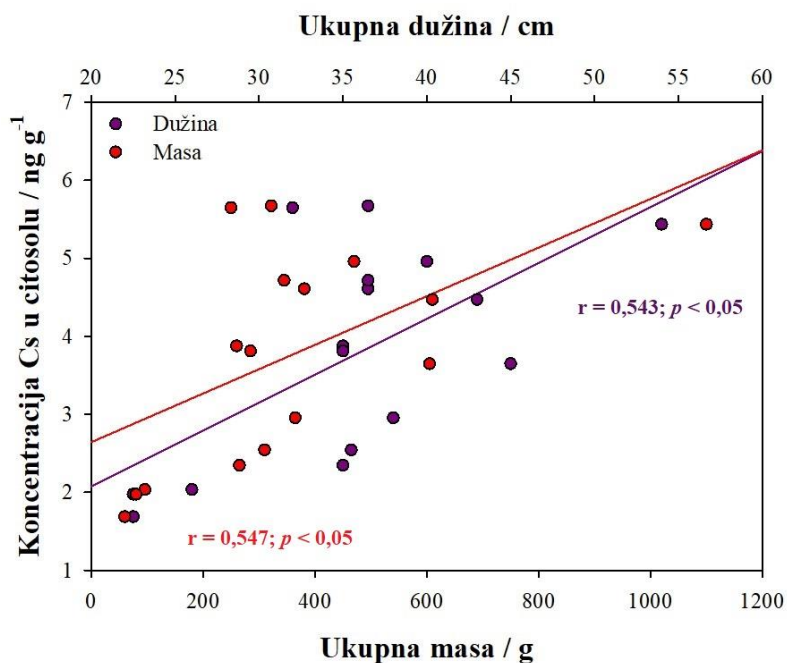
⁺Statistički značajna korelacija prema Spearman Rank Order testu ($p < 0,050$).



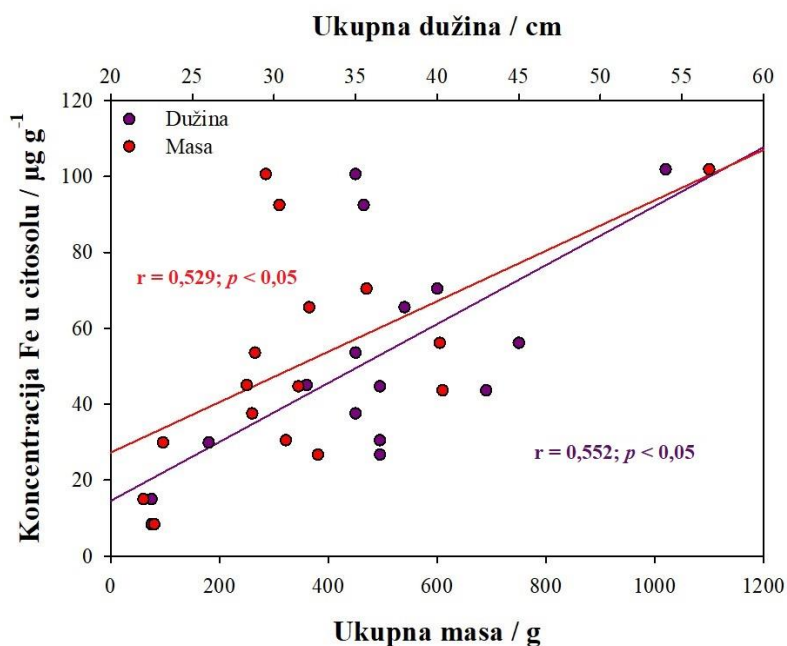
Slika 22. Korelacijska i regresijska analiza međuovisnosti citosolskih koncentracija Bi izmjerenih u jetrama štika (*Esox lucius*) i mase, odnosno ukupne dužine uzorkovanih jedinki. Uzorkovanje je provedeno u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici (n = 16).



Slika 23. Korelacijska i regresijska analiza međuovisnosti citosolskih koncentracija Ca izmjerenih u jetrama štuka (*Esox lucius*) i mase, odnosno ukupne dužine uzorkovanih jedinki. Uzorkovanje je provedeno u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici (n = 16).



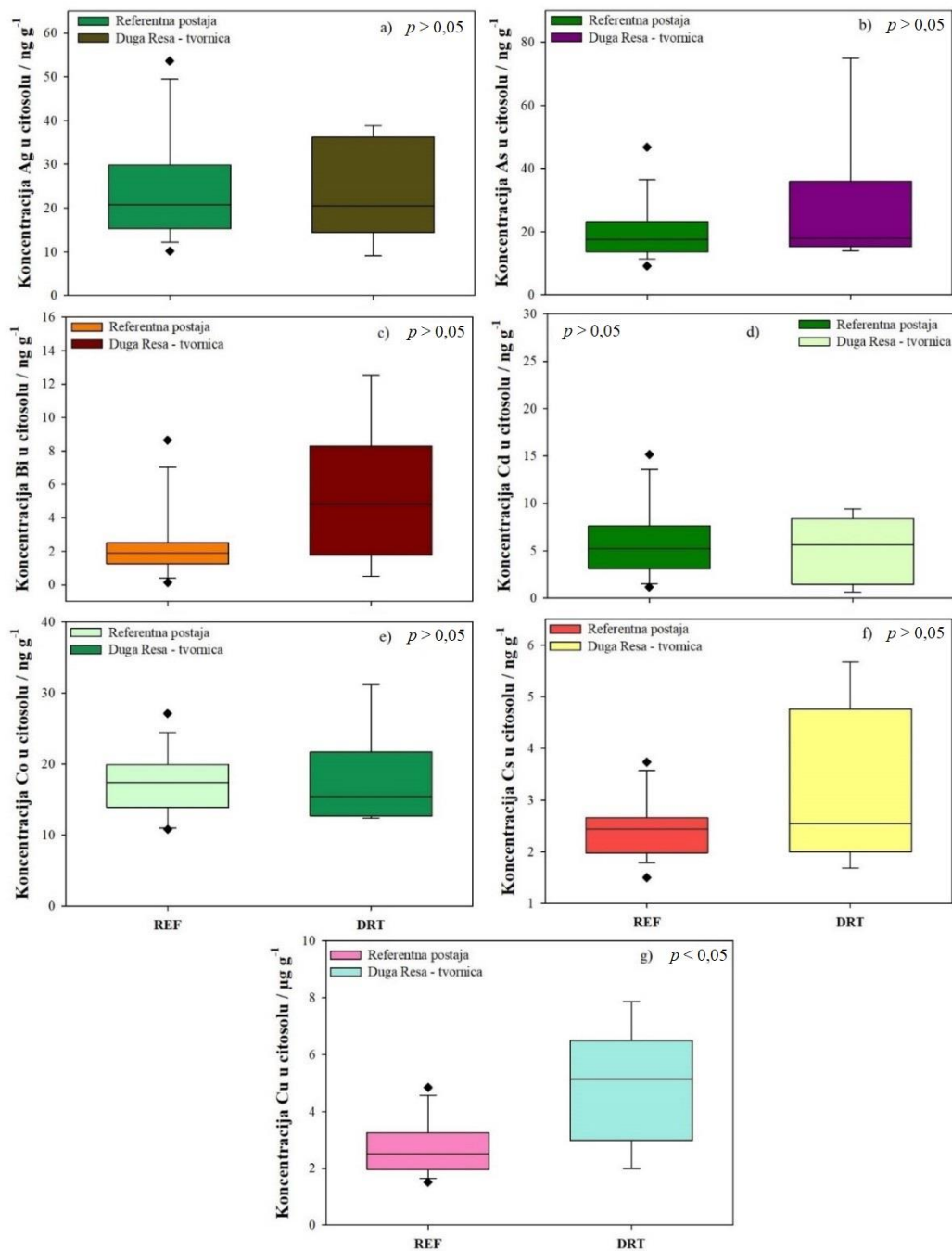
Slika 24. Korelacijska i regresijska analiza međuovisnosti citosolskih koncentracija Cs izmjerenih u jetrama štuka (*Esox lucius*) i mase, odnosno ukupne dužine uzorkovanih jedinki. Uzorkovanje je provedeno u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici (n = 16).



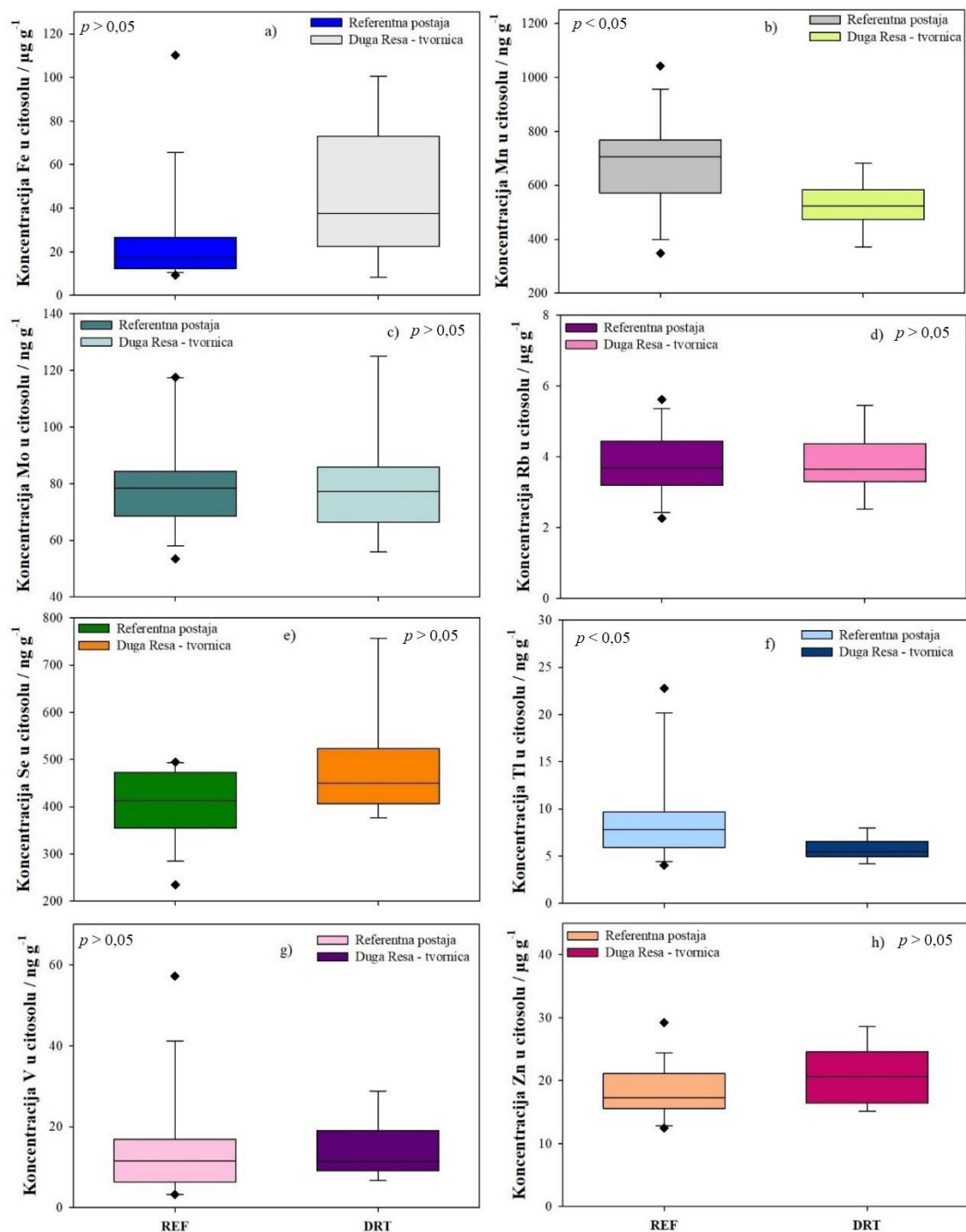
Slika 25. Korelacijska i regresijska analiza međuovisnosti citosolskih koncentracija Fe izmjerenih u jetrama štika (*Esox lucius*) i mase, odnosno ukupne dužine uzorkovanih jedinki. Uzorkovanje je provedeno u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici (n = 16).

Kako je najsnažnija pozitivna povezanost s veličinom štika utvrđena upravo za one elemente za koje su utvrđene i najveće razlike između postaja, odnosno znatno više koncentracije na DRT postaji gdje su ulovljene i najveće štuke, potrebno je isključiti mogućnost da je razlika u veličini štika između postaja bila uzrokom razlike u koncentracijama bioakumuliranih metala.

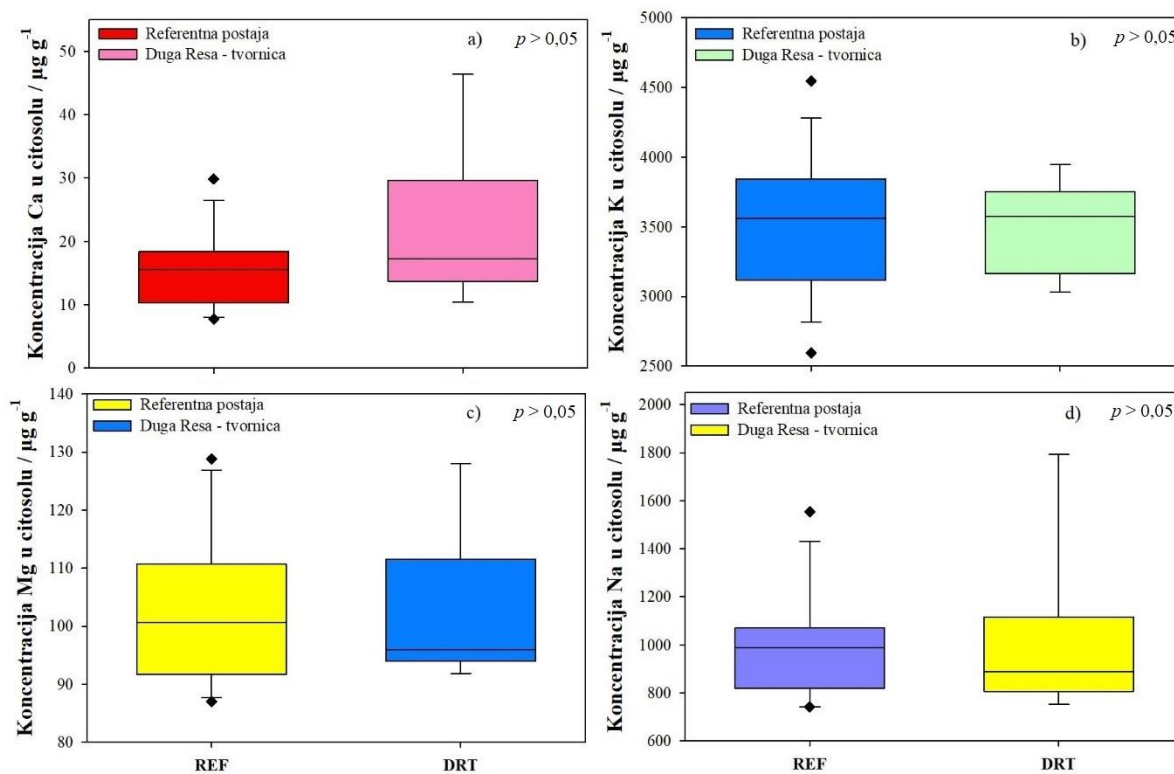
S tom namjerom proveli smo dodatnu usporedbu citosolskih koncentracija 19 elemenata između postaja (Slike 26-31), kojom smo obuhvatili samo ribe usporedivih veličina na objema postajama (maksimalne mase 325 grama, prema najvećoj jedinki na REF postaji). Trendovi razlika između postaja ostali su nepromijenjeni, samo neke razlike više nisu bile statistički značajne, vjerojatno zbog manjeg broja jedinki uključenih u analizu, kao i isključenja nekoliko većih jedinki s nešto višim koncentracijama analiziranih elemenata. No, čak i kada je usporedba provedena samo na malim ribama usporedivih veličina na objema postajama, vidljivo je da su citosolske koncentracije Bi, Fe, Cs i Cu i dalje povišene na postaji DRT, a Cu i statistički značajno. S druge strane, koncentracije Mn, Mo i Tl i dalje su povišene na postaji REF, a Mn i Tl i statistički značajno.



Slika 26. Citosolske koncentracije elemenata u tragovima u jetrama malih štika (*Esox lucius*) (mase do 325 grama), uzorkovanih u rijeci Mrežnici na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Broj jedinki: $n_{REF} = 16$, $n_{DRT} = 9$. Rezultati su prikazani redoslijedom: a) Ag, b) As, c) Bi, d) Cd, e) Co, f) Cs i g) Cu. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa i statistički značajne razlike označene su s $p < 0,05$.



Slika 27. Citosolske koncentracije elemenata u tragovima u jetrama malih štika (*Esox lucius*) (mase do 325 grama), uzorkovanih u rijeci Mrežnici na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenju (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Broj jedinki: $n_{\text{REF}} = 16$, $n_{\text{DRT}} = 9$. Rezultati su prikazani redosljedom: a) Fe, b) Mn, c) Mo, d) Rb, e) Se, f) Tl, g) V i h) Zn. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa i statistički značajne razlike označene su s $p < 0,05$.



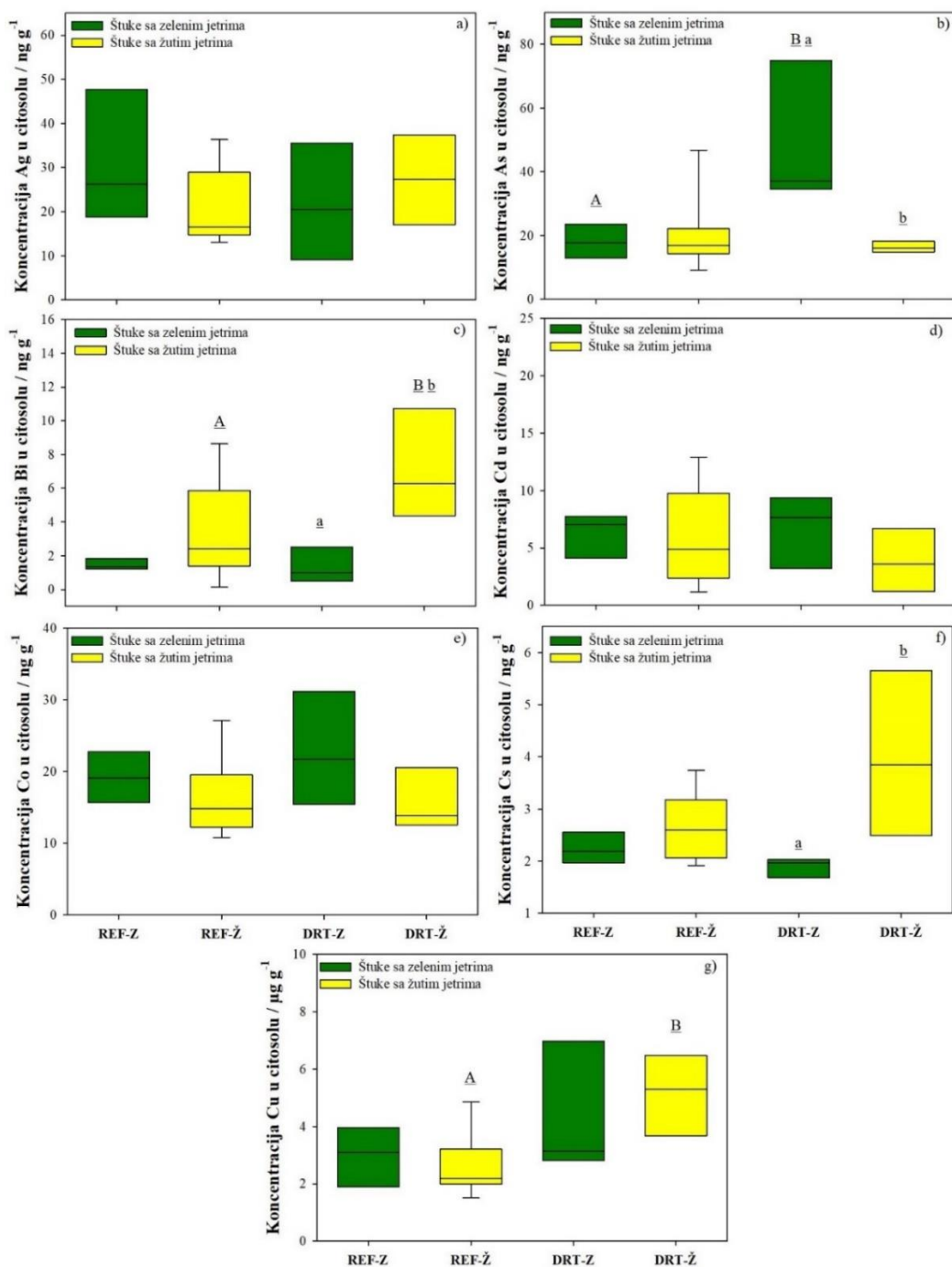
Slika 28. Citosolske koncentracije makroelemenata u jetrama malih štika (*Esox lucius*) (mase do 325 grama), uzorkovanih u rijeci Mrežnici na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Broj jedinki: $n_{\text{REF}} = 16$, $n_{\text{DRT}} = 9$. Rezultati su prikazani redosljedom: a) Ca, b) K, c) Mg i d) Na. Statistička usporedba napravljena je pomoću Mann-Whitney Rank Sum testa ($p > 0,05$ označava izostanak statistički značajnih razlika).

5.4.2. Utjecaj načina prehrane, odnosno razlike između štika sa žutim i zelenim jetrama

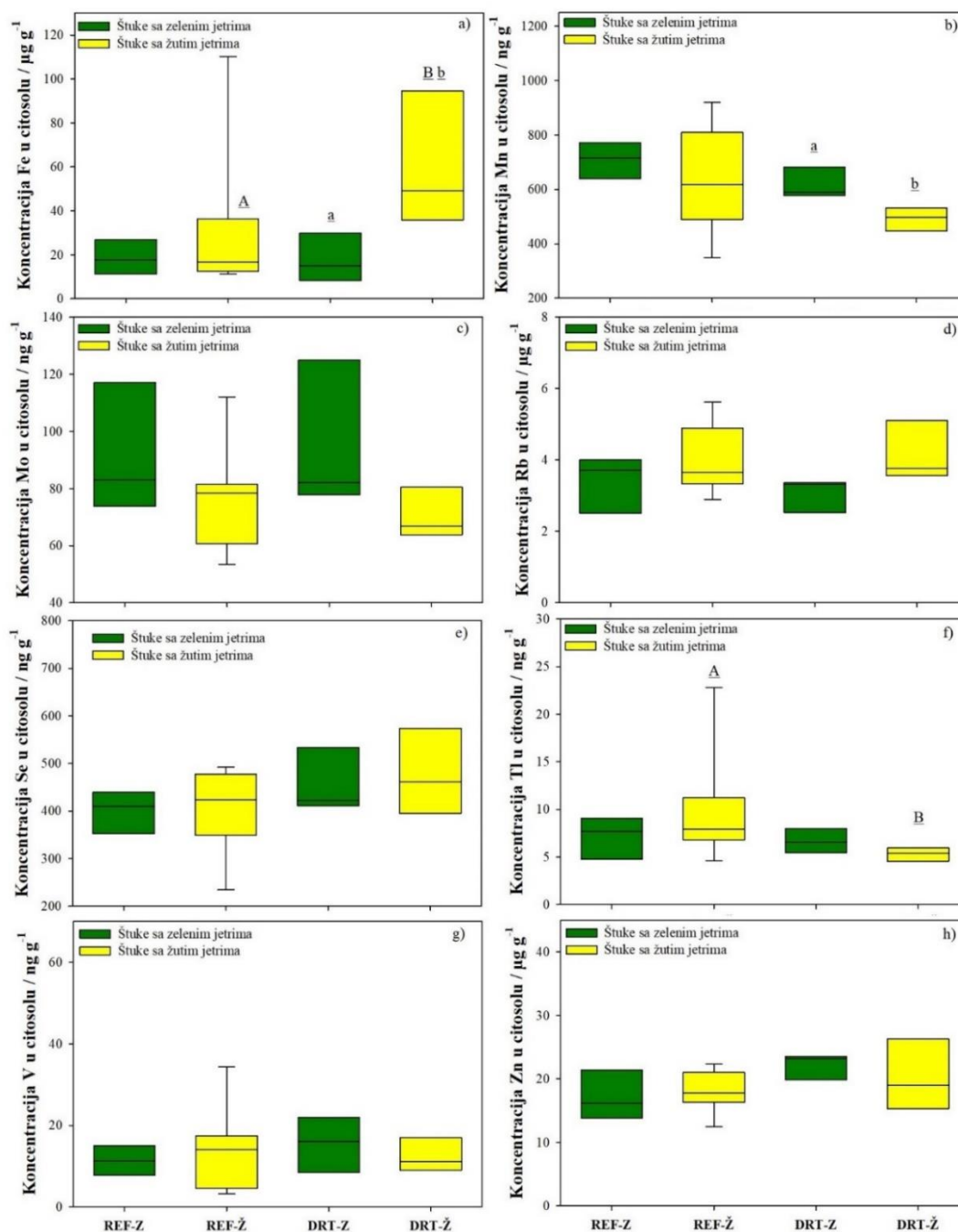
Tijekom sekcije štika opažena je različita boja jetri, od izrazito zelene do raznih nijansi žute i svijetlo smeđe boje, te se ona može grubo svrstati u dvije kategorije – žute i zelene boje. Kako ovakve razlike mogu biti posljedica različitih metaboličkih procesa, istražili smo postoje li i razlike u koncentracijama 19 analiziranih elemenata s obzirom na boju jetre. Usporedbe su provedene na objema postajama, i to samo za skupinu malih riba (do 325 g) kako bismo izbjegli dodatni utjecaj veličine na ostvarene rezultate (Slike 29-31).

Za nekoliko elemenata utvrđene su više citosolske koncentracije u štukama sa zelenom jetrom (As, Mn i Na) u odnosu na štuke sa žutom jetrom, a razlike su za As i Mn bile statistički značajne na DRT postaji, a za Na na REF postaji. Povišene citosolske koncentracije u štukama sa žutom jetrom u odnosu na štuke sa zelenom jetrom utvrđene su za Bi i Cs na objema postajama, a statistički značajno na DRT postaji, te za Fe samo na DRT postaji, i to statistički značajno.

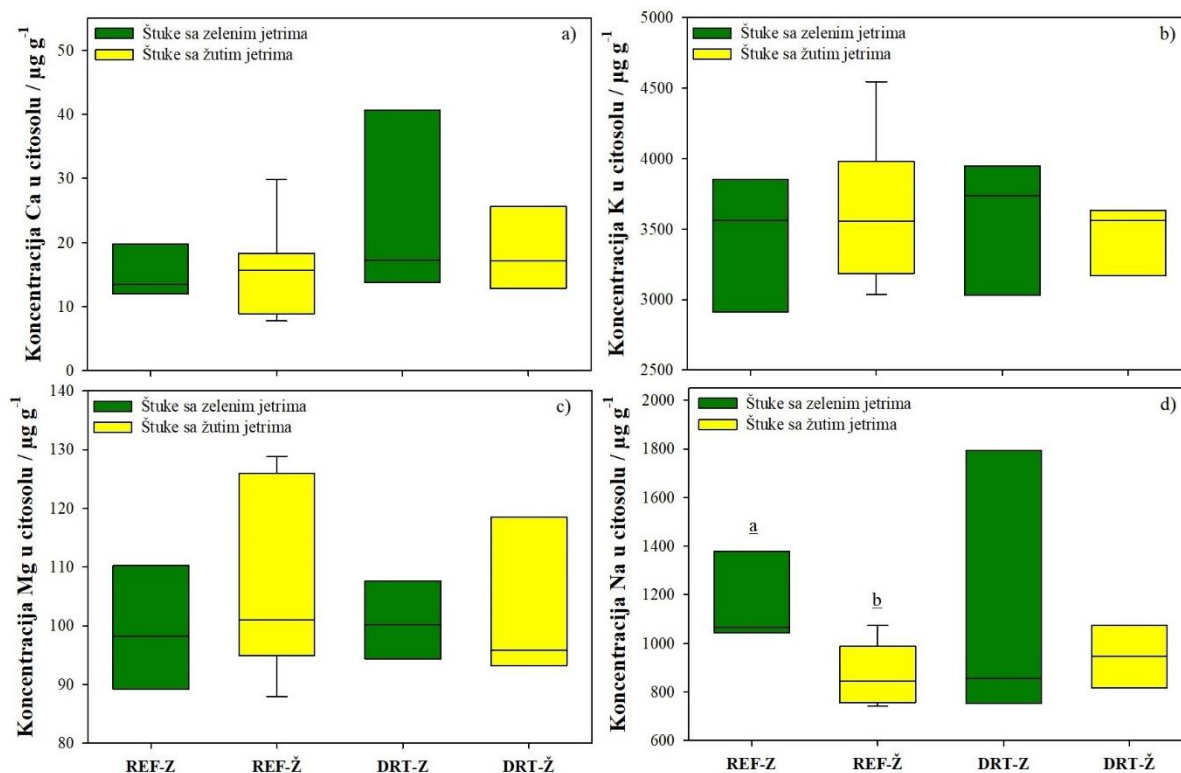
Kada smo proveli i usporedbe koncentracija metala/metaloida između postaja, zasebno za zelene i za žute jetre, uočili smo kako su razlike između postaja za neke elemente izraženije nego kada se sve ribe promatraju zajedno. Na primjer, razlike između postaja, s povišenim vrijednostima na DRT postaji za Bi, Cu i Fe, te s povišenim vrijednostima na REF postaji za Tl, bile su statistički značajne za štuke sa žutim, dok razlika između štika sa zelenim nije bilo. Nasuprot tome, statistički značajno više vrijednosti na REF postaji dobivene su za As u zelenim jetrama, dok razlika između štika sa žutim jetrama nije bilo.



Slika 29. Citosolske koncentracije elemenata u tragovima u jetrama štuca (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Rezultati su prikazani s obzirom na boju jetre (Z – zelena, Ž – žuta), kako slijedi: a) Ag, b) As, c) Bi, d) Cd, e) Co, f) Cs i g) Cu. Broj jedinki: $n_{REF-Z} = 7$; $n_{REF-Ž} = 9$; $n_{DRT-Z} = 3$; $n_{DRT-Ž} = 6$. Oznakama a/b prikazane su statistički značajne razlike između jetara različitih boja unutar jedne postaje, a oznakama A/B između jetara iste boje na dvjema postajama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između postaja te unutar postaje utvrđena je Mann – Whitney Rank Sum testom.



Slika 30. Citosolske koncentracije elemenata u tragovima u jetrama štika (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Rezultati su prikazani s obzirom na boju jetre (Z – zelena, Ž – žuta), kako slijedi: a) Fe, b) Mn, c) Mo, d) Rb, e) Se, f) Tl, g) V i h) Zn. Broj jedinki: $n_{\text{REF-Z}} = 7$; $n_{\text{REF-Ž}} = 9$; $n_{\text{DRT-Z}} = 3$; $n_{\text{DRT-Ž}} = 6$. Oznakama a/b prikazane su statistički značajne razlike između jetara različite boje unutar jedne postaje, a oznakama A/B između jetara iste boje na dvjema postajama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između postaja te unutar postaje utvrđena je Mann – Whitney Rank Sum testom.



Slika 31. Koncentracije makroelemenata u jetrama štuca (*Esox lucius*) uzorkovanih na dvjema postajama, referentnoj (REF) i onečišćenoj (DRT), u travnju/svibnju 2021. godine. Rezultati su prikazani s obzirom na boju jetre (Z – zelena, Ž – žuta), kako slijedi: a) Ca, b) K, c) Mg i d) Na. Broj jedinki: $n_{\text{REF-Z}} = 7$; $n_{\text{REF-Ž}} = 9$; $n_{\text{DRT-Z}} = 3$; $n_{\text{DRT-Ž}} = 6$. Oznakama a/b prikazane su statističke značajne razlike između jetara različitih boja unutar jedne postaje. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) unutar postaje utvrđena je Mann – Whitney Rank Sum testom.

5.4.3. Utjecaj spola, odnosno razlike između mužjaka i ženki

Kako i spol ponekad utječe na bioakumulaciju pojedinih elemenata zbog razlike u fiziologiji mužjaka i ženki štika, proveli smo i preliminarnu analizu razlika u koncentracijama 19 elemenata s obzirom na spol jedinki (Tablice 11 i 12). Analizu smo proveli samo na štukama s onečišćene postaje na rijeci Mrežnici ispred tvornice u Dugoj Resi, budući da je ondje broj mužjaka i ženki bio ujednačeniji, dok su na postaji REF bile ulovljene samo dvije ženke (Tablica 4). Mann-Whitney Rank Sum testom utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u koncentraciji Bi, Mo i Zn između dvaju spolova. Citosolska koncentracija Bi bila je 80% viša kod ženki, dok su citosolske koncentracije Mo i Zn bile otprilike 15-20% više u mužjaka. Usporedbom veličine mužjaka i ženki vidljivo je da su ženke veće (m_M : 271 ± 177 g; m_F : 481 ± 299 g), a kako je ranije utvrđeno da je Bi prisutan u višim koncentracijama u većim ribama, nije moguće isključiti mogućnost da je uzrok višim koncentracijama Bi u ženkama njihova veličina. Stoga smo proveli dodatnu analizu na malim ribama (do 325 g), te je vidljivo da je razlika u citosolskim koncentracijama Bi između mužjaka i ženki postala još izraženija, s 2,75 puta višim koncentracijama u ženki. No, statistička značajnost te razlike se izgubila zbog malog broja jedinki uključenih u analizu. Razlike u koncentracijama Mo i Zn između dvaju spolova također su potvrđene i na skupini malih riba.

Tablica 11. Prikaz medijana citosolskih koncentracija elemenata u tragovima izmjerenih u jetrama štika (*Esox lucius*) u odnosu na spol i masu jedinke. Analiza je provedena za štuke uzorkovane u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici. Legenda: M – mušjaci; F – ženke.

	Ukupan broj jedinki		Jedinke mase do 325 g	
	M	F	M	F
n	9	7	6	3
Ag	29,4	20,1	28,0	20,5
As	19,3	16,5	26,9	15,5
Bi	4,81*	8,73*	3,67	10,1
Cd	6,00	5,12	6,77	1,38
Co	18,7	14,1	18,6	12,8
Cs	2,96	4,72	2,29	3,88
Cu	5,15	3,99	5,58	4,23
Fe	43,6	53,6	37,5	37,6
Mn	518,7	474,0	549,9	474,0
Mo	77,8*	66,5*	79,9	66,5
Rb	3,38	3,86	3,34	3,76
Se	461,5	473,0	468,0	450,4
Tl	5,53	5,48	5,62	5,48
V	10,9	11,4	12,0	11,4
Zn	23,5*	19,8*	23,4	15,4

*Mann-Whitney Rank Sum testom utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,050$).

Tablica 12. Prikaz medijana citosolskih koncentracija makroelemenata izmjerenih u jetrima štika (*Esox lucius*) u odnosu na spol i masu jedinke. Analiza je provedena za štuke uzorkovane u travnju/svibnju 2021. godine na onečišćenoj postaji ispred tvornice u Dugoj Resi, na rijeci Mrežnici. Legenda: M – mužjaci; F – ženke.

	Ukupan broj jedinki		Jedinke mase do 325 g	
	M	F	M	F
n	9	7	6	3
Ca	17,3	13,2	18,0	16,3
K	3737,2	3714,6	3558,6	3585,5
Mg	101,3	96,7	103,9	95,8
Na	925,0	827,4	946,5	827,4

6. RASPRAVA

Cilj rada bio je istražiti bioakumulaciju odabranih metala i metaloida, odnosno 15 elemenata u tragovima i četiri makroelemenata, u jetrama štuke (*E. lucius*) iz rijeke Mrežnice kao bioindikatorskog organizma, i to s obzirom na razinu izloženosti i ovisnost o nekoliko fizioloških čimbenika. Kako bismo to ostvarili, proveli smo uzorkovanja na dvjema postajama pod različitim antropogenim utjecajem, odnosno na onečišćenoj lokaciji ispred nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi (Pamučna industrija Duga Resa) (DRT) te na uzvodnoj referentnoj postaji (REF), na kojoj je zabilježen samo blaži utjecaj okolne poljoprivrede (Dragun i sur. 2022b). U istraživanju smo kao ciljni organ koristili jetru jer je ona središnji metabolički organ ribe te se u njoj pohranjuju, detoksiciraju i dalje raspodjeljuju metali koji u tijelo dolaze iz okoliša (Di Giulio i Hinton 2008). O bioakumulaciji metala u jetrama štuka zasad postoji vrlo mali broj znanstvenih radova, poput radova Đikanović i sur. (2016) (štuke iz jezera Međuvršje u Srbiji; analizirani elementi: As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr i Zn), Łuczyńske i sur. (2019) (štuke iz Mazurskih jezera u Poljskoj; analizirani element: Cd) te Nikolića i sur. (2021) (štuke iz kanala Vizelj u Srbiji; analizirani elementi: As, Cr, Cd, Co, Cu, Fe, Sr, Pb i Zn). Upotreba jetre kao bioindikatorskog organa u istraživanju bioakumulacije metala u ribama opisana je i za druge vrste riba, na primjer za Vardarskog klena (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) (Dragun i sur. 2019), potočnu pastrvu (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (Dragun i sur. 2018) i klena (*Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758)) (Podrug i sur. 2009; Duman i Kar 2012; Dragun i sur. 2015; Rašković i sur. 2018).

U ovome istraživanju, štuke ulovljene na dvjema postajama na rijeci Mrežnici razlikovale su se značajno po veličini, pri čemu su veće (teže i duže) bile štuke na jače onečišćenoj DRT postaji. Veličina ribe ovisi o vrsti staništa, ponašanju i načinu ishrane (Haubrock i sur. 2018) te o njihovom zdravlju i jačini onečišćenja okoliša (Rakovčević i sur. 2018). Zapažanje suprotno od našega objavljeno je za klenove u rijeci Sutli u Hrvatskoj te trima rijekama u Sjevernoj Makedoniji. Ondje su najmanje, a vjerojatno i najmlađe ribe, bile ulovljene na najonečišćenijim postajama, uz pretpostavku da starije ribe napuštaju područja većeg onečišćenja (Dragun i sur. 2013; Jordanova i sur. 2016), što prema našim zapažanjima očito nije svojstveno štuki. Fultonov kondicijski indeks (FCI), naprotiv, bio je nešto niži (iako ne značajno) na DRT postaji. FCI može odražavati negativan utjecaj metala i drugih zagađivala

na metabolizam ribe, ali i manju dostupnost hrane (Filipović Marijić i Raspor 2007; Jordanova i sur. 2016).

6.1. Ukupne i citosolske koncentracije elemenata u tragovima i makroelemenata u jetrama štika iz rijeke Mrežnice – razlike između postaja

Kako bismo procijenili bioakumulaciju metala i metaloida u jetrama štika primijenili smo dva pristupa: određivanje ukupnih koncentracija metala te određivanje citosolskih koncentracija, odnosno koncentracija u topljivoj tkivnoj frakciji. Kao što je već spomenuto, podaci o ukupnoj bioakumulaciji metala/metaloida u jetrama štika vrlo su rijetki, dok podaci o njihovim citosolskim koncentracijama zasad nisu dostupni u znanstvenoj literaturi te su podaci prikupljeni u ovome istraživanju prvi te vrste. Određivanje koncentracija metala i metaloida u topljivoj frakciji dobivenoj centrifugiranjem jetrenog homogenata na $50.000\times g$ značajno je jer omogućuje dobivanje informacija o substancijskim frakcijama koje su potencijalno osjetljive na metale (Giguère i sur. 2006). Budući da značajan udio metala/metaloida može biti detoksiciran (na primjer, vezanjem na granule koje se talože već pri centrifugiranju na $10.000\times g$), vjerojatnost toksičnih učinaka nije uvijek vezana uz ukupnu količinu bioakumuliranog metala/metaloida (McGeer i sur. 2012).

Usporedba rezultata našega istraživanja provedena je s podacima iz tri rada o koncentracijama metala/metaloida u jetrama štika (Đikanović i sur. 2016; Łuczyńska i sur. 2019; Nikolić i sur. 2021), a obuhvatila je njihove ukupne koncentracije. Koncentracijski niz zabilježen u našem istraživanju podudara se s onim objavljenim za jetre štika u istraživanju Đikanović i sur. (2016), sa sljedećim redoslijedom: Fe>Zn>Cu>Mo>Mn>As>Cd,Co, te u istraživanju Nikolića i sur. (2021), sa sljedećim redoslijedom: Fe>Zn>Cu>As,Cd,Co, dok je u radu Łuczyńskiej i sur. (2019) bio analiziran isključivo Cd.

Nadalje, usporedili smo i vrijednosti izmjerenih koncentracija, kako bismo naše rezultate stavili u širi kontekst. Samo u radu Łuczyńskiej i sur. (2019) rezultati su izraženi na mokru masu tkiva, kao i u našem istraživanju, te je koncentracija Cd u jetri štuke ($0,9-15,9 \text{ ng g}^{-1}$) bila usporediva s našim rezultatima. Za usporedbu s druga dva rada preračunali smo naše rezultate na suhu masu, koristeći približan faktor pretvorbe 4 (što odgovara sadržaju vode od 75%,

prema radu Vijayakumar (1987)). U navedenim radovima (Đikanović i sur. 2016; Nikolić i sur. 2021), koncentracije Cd i Co bile su ispod granice detekcije dok su u našem istraživanju bile mjerljive; u radu Nikolića i sur. (2021) i koncentracije As bile su ispod granice detekcije. Usporedbom ostalih elemenata utvrđeno je da su u istraživanju Đikanović i sur. (2016) na štukama iz jezera Međuvršje, koje je izloženo velikom utjecaju industrijskih i komunalnih otpadnih voda, koncentracije As bile 10 puta više, a koncentracije Mo tri puta više nego u štukama iz rijeke Mrežnice. No, koncentracije Cu, Fe i Zn bile su usporedive sa štukama iz rijeke Mrežnice na REF postaji, dok su štuke s DRT postaje imale čak izraženiju bioakumulaciju ova tri metala. I, naposljetku, koncentracije Mn bile su znatno više u štukama iz rijeke Mrežnice, tri puta na REF te dva puta na DRT postaji. Usporedbom s istraživanjem Nikolića i sur. (2021) na štukama iz kanala Vizelj, koji je onečišćen industrijskim i komunalnim vodama bez prethodnog pročišćavanja, utvrđeno je da su koncentracije Cu bile otprilike dvostruko više nego u štukama iz rijeke Mrežnice. Koncentracije Zn su, kao i u prethodnoj usporedbi, bile približno jednake u štukama iz kanala Vizelj i REF postaje na rijeci Mrežnici, dok su vrijednosti izmjerene na DRT postaji rijeke Mrežnice bile više. Koncentracije Fe bile su otprilike dvostruko više u štukama iz kanala Vizelj u odnosu na našu REF postaju, ali oko 25% niže u odnosu na DRT postaju. Na temelju prikazanih usporedbi može se zaključiti da su koncentracije nekoliko metala (Mn na obje postaje te Cu, Fe i Zn na DRT postaji) povišene u odnosu na ribe iste vrste iz slatkovodnih sustava koji se smatraju umjereno onečišćenima.

Ukupne i citosolske koncentracije nekoliko elemenata u tragovima (Ag, As, Cd, Co, Rb i V) te sva četiri makroelementa (Ca, K, Mg i Na) zabilježene su u približno jednakim koncentracijama u jetrama štuca uzorkovanih na objema postajama rijeke Mrežnice. No, za ostale analizirane elemente utvrđene su razlike između dviju postaja kao mogući pokazatelj različite izloženosti tim elementima u okolišu, odnosno izravne posljedice onečišćenja okoliša.

Na postaji DRT, pod dugogodišnjim utjecajem tvornice tekstila, povišene ukupne i/ili citosolske koncentracije utvrđene su za Bi, Cs, Cu, Fe, Se i Zn. Pri tome su najveće razlike između dviju postaja zabilježene za Bi i Fe (2,5-3,5 više koncentracije u jetrama štuca na postaji DRT) te potom za Cs i Cu (60-90% više koncentracije u jetrama štuca na postaji DRT). Koncentracije Bi, Fe, Cs, Cu i Zn u partikularnoj frakciji vode te u sedimentu rijeke Mrežnice izmjerene su u višim koncentracijama na postaji DRT nego REF, kao i koncentracija otopljenog Cu i Fe u vodi (Dragun i sur. 2022b) što ukazuje na mogućnost da je povećana bioakumulacija doista rezultat povećane izloženosti štuca tim elementima na postaji kod

nekadašnje tvornice. Frančišković-Bilinski i sur. (2017) također su ukazali na povišene koncentracije Fe kod nekadašnje tvornice, vjerojatno uslijed taloženja ugljena koji je bio korišten u radu tvornice, kao i povišene koncentracije Cu, čak iznad granica postavljenih u SAD-u za jako onečišćene sedimente. Izvor Cu u sedimentu Mrežnice moglo bi biti nekadašnje ispuštanje otpadnih voda tekstilne industrije u rijeku, budući da se Cu koristi kao komponenta u tekstilnim bojama (napose plavim i zelenim) (Samecka-Cymerman i Kepmers 2007; Hurley i sur. 2017). Cinkove soli su se u povijesti također koristile u proizvodnji tekstila, za bojanje i omekšavanje tkanina (Hurley i sur. 2017).

Na postaji REF, pod utjecajem poljoprivrednih aktivnosti okolnog stanovništva i ispiranja poljoprivrednog tla, povišene ukupne i/ili citosolske koncentracije utvrđene su za Mn, Mo i Tl. Pri tome su veće razlike zabilježene za Mn i Tl (40% više koncentracije u jetrama štika na postaji REF u odnosu na postaju DRT) nego za Mo, dok su za sva tri metala one bile manje izražene u odnosu na povišenja uočena na postaji DRT. Koncentracije Mn u partikularnoj frakciji vode te u sedimentu rijeke Mrežnice izmjerene su u višim koncentracijama na postaji REF nego DRT, kao i koncentracija otopljenog Tl u vodi (Dragun i sur. 2022b), pa je prema tome to mogući uzrok povećane bioakumulacije tih metala na referentnoj postaji. Kako je Mn tipičan sastavni element gnojiva, onečišćenje riječnog sedimenta manganom, kao i njegovu povišenu bioakumulaciju na postaji REF moguće je pripisati njegovoj primjeni u poljoprivredi (Samecka-Cymerman i Kepmers 2007).

Naposljetku, zanimljivo je uočiti da su upravo oni elementi koji se u jetrama štika pojavljuju u povišenoj koncentraciji na jednoj ili drugoj postaji (DRT: Cu, Fe, Zn; REF: Mn), kao vjerojatni pokazatelji povijesnog onečišćenja iz nekadašnje tvornice tekstila, odnosno utjecaja poljoprivrede na okoliš, isti elementi za koje je utvrđeno da su u jetrama štika iz rijeke Mrežnice prisutni u koncentracijama višim nego u štukama iz drugih industrijski onečišćenih slatkovodnih sustava (Đikanović i sur. 2016; Nikolić i sur. 2021).

6.2. Zastupljenost elemenata u tragovima i makroelemenata u citosolskoj frakciji jetre štuke

Zastupljenost analiziranih elemenata u citosolskoj, odnosno topljivoj frakciji jetre izračunali smo kao omjer izmjerenih citosolskih i ukupnih koncentracija elemenata u tragovima, odnosno

makroelemenata, i izrazili u postotku (Dragun i sur. 2018). O afinitetu pojedinog elementa za vezanje na određene stanične komponente ovisit će hoće li njegova zastupljenost u topljivoj staničnoj frakciji biti veća ili manja, što utječe i na njegovu potencijalnu toksičnost. Metali i metaloidi tako mogu biti vezani na biomolekule koje sudjeluju u metabolizmu stanice (razni enzimi i proteini prisutni u staničnom citosolu), što može rezultirati toksičnim učincima; no mogu se vezati i na one biomolekule koje služe za pohranjivanje ili detoksikaciju, poput metalotioneina, koje su također prisutne u citosolu; a mogu se i detoksicirati vezanjem na granule koje čine netopljivi dio stanice (Dragun i sur. 2018). Metali i metaloidi prisutni u topljivoj staničnoj frakciji mogu blokirati funkcionalne skupine biomolekula, istisnuti esencijalne metale iz njihovih veznih mjesta ili izmijeniti aktivnu konformaciju biomolekula (Mason i Jenkins 1995).

U štukama iz rijeke Mrežnice, izračunati omjeri pokazali su da se u citosolskoj frakciji jetre u velikom postotku (> 70%) zadržavaju sljedeći esencijalni elementi: Cu, K, Na, Se i Zn; te sljedeći neesencijalni elementi: Ag, As, Bi, Cd, Cs i Rb. U slučaju esencijalnih elemenata, to možemo povezati s njihovom funkcijom u metaboličkim procesima (Kamunde i MacPhail 2008; Monna i sur. 2011; Krasnići i sur. 2013), no u slučaju neesencijalnih elemenata možemo govoriti o potencijalu za razvoj toksičnih učinaka (Dragun i sur. 2018). No, budući da citosol sadrži i proteine poput metalotioneina koji sudjeluju u detoksikaciji nekih metala (Ag, Bi, Cd, Cu, Zn), sama visoka prisutnost tih metala u citosolu ne znači da će sigurno doći do toksičnog učinka (Bonneris i sur. 2005). U skladu s tim, česta su izvješća o visokom udjelu Ag i Cd u citosolu i njihovoj detoksikaciji vezanjem na metalotioneine (Langston i sur. 2002; Van Campenhout i sur. 2008; Rosabal i sur. 2015). S druge strane, visoka zastupljenost As u citosolu obično ukazuje na njegovo vezanje na biomolekule osjetljive na metale te može ukazivati na potencijalnu toksičnost (Rosabal i sur. 2015). Udio od 50-70% zabilježen je za Co, Mg i V, dok je manje od 50% ukupne količine zastupljeno u citosolu za Ca, Fe, Mn, Mo i Tl. Od navedenih elemenata samo je Tl neesencijalan te njegova veća prisutnost u netopljivoj frakciji stanice upućuje na značajan kapacitet stanice za njegovu detoksikaciju, dok u slučaju esencijalnih elemenata možemo govoriti o njihovom sudjelovanju u izgradnji staničnih struktura, vezanju unutar organela te vezanju na proteine za pohranjivanje. Tako je, na primjer, za Tl poznato da se u velikoj mjeri detoksicira vezanjem na granule (Lapointe i Couture 2009; Lapointe i sur. 2009), dok se Fe veže na feritin koji se pohranjuje u lizosomima te se na taj način skladišti kao rezerva organizma (Kurz i sur. 2008).

Unatoč mogućnosti da je dio metala i metaloida u citosolu detoksiciran, njihova visoka zastupljenost u toj osjetljivoj staničnoj frakciji ipak predstavlja potencijalnu opasnost za pojavu toksičnosti, posebno u slučaju neesencijalnih elemenata (Dragun i sur. 2018).

Usporedbom s potočnom pastrvom (*S. trutta*) iz rijeke Krke (Dragun i sur. 2018) i babuškom (*Carassius gibelio* (Bloch, 1782)) iz rijeke Ilove (De Coninck i sur. 2018) vidimo da se ove tri riblje vrste donekle razlikuju po načinu korištenja metala i metaloida u metabolizmu, njihovom pohranjivanju i detoksikaciji (Tablica 13). Tako jetra pastrve ima veći udio Co, Fe, Mn, Mo, Tl i V u citosolu u odnosu na jetru štuke, dok s druge strane jetra štuke ima veći udio Ag, As, Cu i Zn u citosolu u odnosu na jetru pastrve. Jetra babuške ima općenito najvišu zastupljenost metala/metaloida u topljivoj tkivnoj frakciji, što može biti i znak njene potencijalno veće osjetljivosti na izloženost metalima (De Coninck i sur. 2018). Razlike između vrsta u načinu raspodjele metala/metaloida nastaju vjerojatno zbog njihovih različitih fizioloških karakteristika (Skoric i sur. 2012). Za točnije utvrđivanje na koje citosolske komponente se pojedini metali i metaloidi vežu potrebno je stoga provesti dodatna istraživanja.

Tablica 13. Usporedba zastupljenosti elemenata u citosolskoj frakciji jetre u štukama (*Esox lucius*) uzorkovanim u rijeci Mrežnici, potočnim pastrvama (*Salmo trutta*) uzorkovanim u rijeci Krki (Dragun i sur. 2018) i babušcima (*Carassius gibelio*) uzorkovanim u rijeci Ilovi (De Coninck i sur. 2018).

	Štuka, Mrežnica	Potočna pastrva, Krka	Babuška, Ilova
> 70 %	Ag, As, Bi, Cd, Cs, Cu, K, Na, Rb, Se, Zn	Cd, Co, Cs, K, Na, Rb, Se, V	Ag, As, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Se, Zn
50-70 %	Co, Mg, V	Ag, As, Mg, Cu, Fe, Mn, Mo, Tl, Zn	Ca
< 50 %	Ca, Fe, Mn, Mo, Tl	Ca	-

Nadalje smo istražili povezanost zastupljenosti metala/metaloida u citosolskoj frakciji i ukupno akumulirane količine tih elemenata u jetrama štuka izračunavanjem korelacijskih koeficijenata (r). Namjera nam je pri tome bila utvrditi na koji se način stanična raspodjela metala i metaloida mijenja prilikom povećane izloženosti metalima/metaloidima i njihove

povećane bioakumulacije u jetrama štika, budući da je u literaturi opisano da povećana okolišna izloženost može izazvati preraspodjelu metala i metaloida među citosolskim ligandima (Langston i sur. 2002).

Visoka pozitivna korelacija upućivala je na povećanje zastupljenosti pojedinog elementa u citosolskoj frakciji kod povišene bioakumulacije, što znači da će se dodatno unesena količina toga elementa u većoj mjeri raspodjeljivati u citosol uz veću mogućnost izazivanja toksičnog učinka. Visoke i statistički značajne pozitivne korelacije ($r > 0,500$) dobivene su za Bi i Cu. U skladu s tim, veća je zastupljenost oba metala u citosolu bila na onoj postaji na kojoj je bila viša njihova ukupna bioakumulacija, odnosno na postaji DRT. Jednako su tako i Kamunde i MacPhail (2008) opisali povećanu akumulaciju Cu u topljivoj staničnoj frakciji u jetri kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) pri povišenoj izloženosti, vjerojatno zbog dominantnog vezanja na metalotioneine i glutation.

Visoka negativna korelacija upućivala je na povećanje zastupljenosti pojedinog elementa u netopljivom dijelu stanice, što znači da će se dodatno unesena količina toga elementa u većoj mjeri vezati na granule te ostale netopljive stanične komponente, smanjujući tako vjerojatnost izazivanja toksičnog učinka. Visoke i statistički značajne negativne korelacije ($r < -0,500$) dobivene su za Cs, Mo i Mg. U skladu s tim, veća je zastupljenost ova tri metala u citosolu bila na onoj postaji na kojoj je bila niža ukupna bioakumulacija, odnosno Cs na REF postaji, a Mo i Mg na DRT postaji.

6.3. Utjecaj veličine kao fiziološkog čimbenika

Na akumulaciju metala/metaloida u organizmu mogu utjecati različiti procesi, koji mogu biti na neki način povezani s veličinom (odnosno starošću) ribe, poput brzine metabolizma, učestalosti i načina ishrane te trajanja izloženosti metalima/metaloidima iz okoliša. Tako, na primjer, manje ribe obično brže filtriraju vodu i imaju brži metabolizam što u nekim slučajevima dovodi i do povećane bioakumulacije pojedinih elemenata, odnosno javlja se negativna korelacija između koncentracija akumuliranih metala/metaloida i veličine ribe (Wiener i Giesy 1979). S druge strane, veće ribe mogu biti duže izložene metalima/metaloidima u okolišu te iz tog razloga postoji mogućnost izraženije bioakumulacije u njihovim organima za neke elemente, odnosno javlja se pozitivna korelacija između koncentracija akumuliranih

metala/metaloida i veličine ribe (Yi i Zhang 2012; Liu i sur. 2015; Jia i sur. 2017; Balzani i sur. 2021). Za štuke je nadalje zanimljivo da se starenjem počinju hraniti organizmima viših trofičkih razina, što također može utjecati na bioakumulaciju raznih elemenata (Balzani i sur. 2022).

Rezultati našega istraživanja pokazali su da se značajna pozitivna korelacija, odnosno veća koncentracija u jetrama većih štuca, javlja za Bi, Cs i Fe. Ova pozitivna korelacija može se objasniti većom dužinom izlaganja (Rakovčević i sur. 2018), posebno jer su u pitanju dva neesencijalna metala za koje u organizmu ne postoji fiziološka regulacija te Fe koje ima sklonost pohranjivanju i stvaranju rezervi. Pozitivna ovisnost koncentracije metala o veličini ribe već je i prije opisana za Fe, na primjer u škrigama klena (Dragun i sur. 2007) i smuđa (*Stizostedion lucioperca*) (Tekin-Özan i Kir 2006) te za Bi u mišićima štuca (Omrčen 2022).

Značajna negativna korelacija, odnosno veće koncentracije u manjih štuca, zabilježena je za Ca. Ta negativna korelacija između veličine i akumulacije metala može biti i rezultat ubranog rasta tkiva u odnosu na brzinu unosa metala; manje ribe u tom slučaju imaju veći potencijal unosa nego veće (Authman 2008).

Budući da su sva tri elementa, Bi, Cs i Fe, za koje je utvrđeno da su povišeni u većim ribama, bila prisutna u većim koncentracijama na DRT postaji gdje su i ribe veće, proveli smo dodatnu usporedbu između postaja, kako bismo isključili mogućnost da je uzrok razlika između postaja veličina štuca. Usporedili smo jedinke na postaji DRT i REF maksimalne mase do 325 g (prema najvećoj jedinki s REF postaje) i dobili sličan trend; citosolske koncentracije Bi, Cs i Fe i dalje su bile povišene na postaji DRT. Dakle, iako su za Bi, Cs i Fe citosolske koncentracije više u većim ribama s DRT postaje, ipak povišene vrijednosti na toj postaji nisu isključivo posljedica veličine štuca, već vjerojatno i okolišne izloženosti.

6.4. Usporedba citosolskih koncentracija u štukama sa žutim i zelenim jetrama

Kako je već detaljno objašnjeno u uvodu, vjerojatan razlog pojave izrazito zelene jetre u ribama je prehrana siromašna ribljim mesom, odnosno nedostatak aminokiseline taurina te posljedično nagomilavanje biliverdina u jetri (Takagi i sur. 2006). Za štuke je zanimljivo da su veće jedinke gotovo potpuno piscivorne, dok se male hrane pretežno beskralješnjacima

(Sammons i sur. 1994), što je u skladu s činjenicom da smo zelene jetre pronašli isključivo među vrlo malim ribama, dok su sve veće jedinke imale žute jetre. Stoga nam je namjera bila utvrditi postoje li razlike u bioakumulaciji metala s obzirom na boju jetre, odnosno s obzirom na razlike u načinu prehrane štika.

Pokazalo se da su unutar iste postaje, dakle pri istoj razini izloženosti metalima/metaloidima, štuke sa zelenim jetrama imale više koncentracije As, Mn i Na od štika sa žutim jetrama, te bi se prema tome povećani unos As, Mn i Na mogao povezati uz prehranu siromašnu ribljim mesom. Nasuprot tome, štuke sa žutim jetrama imale su više koncentracije Bi, Cs i Fe u odnosu na štuke sa zelenim jetrama, te bi se povećani unos Bi, Cs i Fe mogao povezati uz prehranu bogatiju ribljim mesom. Stoga su, na primjer, i razlike između postaja za Bi i Fe bile očite kod štika sa žutim jetrama, dok je razina tih metala u štukama sa zelenim jetrama bila usporediva na dvjema postajama. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se potvrdio utjecaj načina prehrane na bioakumulaciju ovih metala. No, zbog ovakvih razlika, koje mogu biti posljedica različitog načina prehrane pojedinih jedinki, moguće je podcijeniti razlike između postaja ako se sve ribe proučavaju zajedno.

6.5. Povezanost spola i citosolskih koncentracija elemenata u tragovima i makroelemenata

Na razlike u koncentracijama metala/metaloida u organima s obzirom na spol ribe utječe više čimbenika, poput načina i sastava prehrane te razlika u potrebama metabolizma s obzirom na stadij reproduktivnog ciklusa (Rajkowska i Protasowicki 2013). Razlike između spolova možemo očekivati u jetri budući da ona ima značajnu ulogu u reproduktivnom ciklusu, točnije u procesu vitelogeneze, odnosno stvaranja žumanjka (Dragun i sur. 2015). No, unatoč tome, u istraživanju provedenom na jetri potočne pastrve (*S. trutta*) pokazalo se da nema povezanosti između spola i koncentracija metala (Dragun i sur. 2018), dok su za istu vrstu drugi autori uočili povezanost za neke metale, poput As i Cu (Foata i sur. 2009; Monna i sur. 2011). Nadalje, Rajkowska i Protasowicki (2013) pokazali su da nema značajnih razlika između spolova u koncentracijama Cu, Fe, Mn i Zn u jetrama štuke i deverike (*Abramis brama* (Linnaeus, 1758)).

No, u našem istraživanju pokazalo se da statistički značajne razlike u citosolskim koncentracijama nekih elemenata između spolova postoje, a to se odnosilo prvenstveno na 80%

(na cijelom skupu podataka) ili 2,8 puta (na skupini malih riba) više koncentracije Bi u jetrama ženki te 15-20% (na cijelom skupu podataka) ili 20-50% (na skupini malih riba) više koncentracije Mo i Zn u jetrama mužjaka. Više koncentracije Bi u ženkama nego mužjacima štuke zabilježene su i u mišiću štuke iz rijeke Mrežnice (Omrčen 2022). Na temelju toga, preliminarni rezultati ukazuju da su u slučaju povišene izloženosti u okolišu ženke osjetljivije na moguću toksičnost neesencijalnog metala bizmuta. Nadalje, dobiveni se rezultati odnose na proljetno razdoblje vrlo niskih gonadosomatskih indeksa, dakle razdoblje neposredno nakon mrijesta, te je značajno utvrditi promjene i ovisnosti koje se događaju u razdoblju jesenske pripreme za mrijest ili samoga razdoblja mrijesta krajem zime ili u rano proljeće (ožujak, travanj) (Pike Caster 2018).

7. ZAKLJUČAK

Od 19 elemenata izmjerenih u jetrama štika iz rijeke Mrežnice u proljeće 2021. na dvjema različito onečišćenim postajama, povišene ukupne/citosolske koncentracije Bi, Cs, Cu, Fe, Se i Zn utvrđene su na postaji ispred nekadašnje tvornice tekstila u Dugoj Resi (DRT), dok su koncentracije Mn, Mo i Tl bile povišene na uzvodnoj referentnoj postaji (REF) izloženoj blagom poljoprivrednom onečišćenju. Dobiveni rezultati o bioakumulaciji metala/metaloida u skladu su s podacima o onečišćenju vode/sedimenta rijeke Mrežnice. Koncentracije Cu, Fe i Zn na DRT postaji te Mn na objema postajama u jetrama štika iz rijeke Mrežnice bile su više nego u štukama iz drugih industrijski onečišćenih slatkovodnih sustava.

Za Ag, As, Bi, Cd, Cs, Cu, K, Na, Rb, Se i Zn utvrđena je visoka zastupljenost (> 70%) u topljivoj frakciji jetre, nešto manja (50-70%) za Co, Mg i V, dok je manje od 50% ukupne količine Ca, Fe, Mn, Mo i Tl prisutno u citosolu. Za Bi i Cu utvrđeno je da im se zastupljenost u citosolu dodatno povećava s povećanom bioakumulacijom, dok se zastupljenost Cs, Mo i Mg u citosolu smanjuje s povećanjem bioakumulacije, odnosno povećava se njihovo vezanje unutar netopljivog dijela stanice. Iako je moguće da je dio metala/metaloida prisutnih u citosolu detoksiciran (na primjer vezanjem na metalotioneine), njihova visoka zastupljenost u citosolu ipak predstavlja izvjesnu opasnost za razvoj toksičnih učinaka, posebno u slučaju neesencijalnih i izrazito toksičnih elemenata.

Veličina, spol i način ishrane (veća ili manja zastupljenost ribljeg mesa u hrani) mogu utjecati na koncentracije nekih metala/metaloida akumuliranih u jetri štuke. Na primjer, Bi, Cs i Fe bili su akumulirani u višim koncentracijama u većim ribama nego manjim, dok je za Ca utvrđeno suprotno; Bi je bio viši u ženkama nego mužjacima, za razliku od Mo i Zn; štuke sa zelenim jetrama (prehrana vjerojatno bogatija beskralješnjacima) imale su više koncentracije As, Mn i Na od štika sa žutim jetrama (prehrana vjerojatno bogatija ribama), dok je suprotno utvrđeno za Bi, Cs i Fe.

Budući da su istraživanja bioakumulacije metala/metaloida u jetrama štika vrlo rijetka, podatci prikupljeni u ovom istraživanju uvelike će doprinijeti boljem poznavanju i razumijevanju sudbine metala u organima ovog bioindikatorskog organizma, koji je i zbog svoje jako izražene teritorijalnosti prikladan za praćenje onečišćenja slatkovodnih sustava.

8. LITERATURA

- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C. (1998): Influence of ecological factors on accumulation of metal mixtures. U: Langston, W. J., Bebianno, M. J. (ur.) *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. London: Chapman and Hall, str. 351-386.
- Authman, M. M. N. (2008): *Oreochromis niloticus* as a biomonitor of heavy metal pollution with emphasis on potential risk and relation to some biological aspects. *Global Veterinaria* 2: 104-109.
- Balzani, P., Haubrock, P. J., Russo, F., Kouba, A., Haase, P., Veselý, L., Masoni, A., Tricarico, E. (2021): Combining metal and stable isotope analyses to disentangle contaminant transfer in a freshwater community dominated by alien species. *Environmental Pollution* 268: 115781.
- Balzani, P., Kouba, A., Tricarico, E., Kourantidou, M., Haubrock, P. J. (2022): Metal accumulation in relation to size and body condition in an all-alien species community. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 25848-25857.
- Berghaus, K., Spencer, J. R., Westley, P. A. H. (2019): Contemporary phenotypic divergence of an introduced predatory freshwater fish, the northern pike (*Esox lucius*). *Evolutionary Ecology Research* 20, 487-504.
- Bonneris, E., Giguère, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L., Campbell, P. G. C. (2005): Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 71: 319-334.
- Bradley, R. W., Sprague, J. B. (1985a): Accumulation of zinc by rainbow trout as influenced by pH, water hardness and fish size. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4: 685-694.
- Bradley, R. W., Sprague, J. B. (1985b): The influence of pH, water hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 731-736.

- Bruździak, P., Panuszko, A., Kaczkowska, E., Piotrowski, B., Dagher, A., Demkowicz, S., Stangret, J. (2018): Taurine as a water structure breaker and protein stabilizer. *Amino Acids* 50: 125-140.
- Bry, C. (1996): Role of vegetation in the life cycle of pike. U: Craig, J. F. (ur.) *Pike: Biology and Exploitation*. London: Chapman & Hall, str. 45-67.
- Cai, C., Ren, S., Cui, G., Ni, Q., Li, X., Meng, Y., Meng, Z., Zhang, J., Su, X., Chen, H., Jiang, R., Lu, J., Ye, Y., Cao, X. (2020): Short-term stress due to dietary pectin induces cholestasis, and chronic stress induces hepatic steatosis and fibrosis in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 516: 734607.
- Chiwa, M., Onikura, N., Ide, J., Kume, A. (2012): Impact of N-saturated upland forests on downstream N pollution in the Tataru River basin, Japan. *Ecosystems* 15: 230-241.
- Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F. (2003): Fish as bioindicators. U: Markert, B., Breure, A., Zechmeister, H. (ur.) *Bioindicators and Biomonitoring*. Elsevier Science Ltd., str. 639-676.
- Comhaire, S., Blust, R., Van Ginneken, L., Vanderborght, O. L. J. (1994): Cobalt uptake across the gills of the common carp, *Cyprinus carpio*, as a function of calcium concentration in the water of acclimation and exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 109: 63-76.
- Craig, J. F. (2008): A short review of pike ecology. *Hydrobiologia* 601: 5-16.
- Csuros, M., Csuros, C. (2002): *Environmental Sampling and Analysis for Metals*. Lewis Publishers.
- Čerkez, T. (2021): Geokemijske značajke vode i sedimenta rijeke Mrežnice. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Dautović, J. (2006): Određivanje metala u prirodnim vodama masenom spektrometrijom visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- De Coninck, T., Nobels, A., Vanheertum, I. (2018): Metal bioaccumulation and biomarker responses in the liver of Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) from the Croatian river Ilova. Preddiplomski rad, Faculty Education, Health and Social work, HoGent, Belgija.

- Depledge, M. H., Rainbow, P. S. (1990): Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97C: 1-7.
- Di Giulio, R. T., Hinton, D. (2008): *The Toxicology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press.
- Dragun, Z., Raspor, B., Podrug, M. (2007): The influence of the season and the biotic factors on the cytosolic metal concentrations in the gills of the European chub (*Leuciscus cephalus* L.). *Chemosphere* 69: 911-919.
- Dragun, Z., Roje, V., Mikac, N., Raspor, B. (2009): Preliminary assessment of total dissolved trace metal concentrations in Sava River water. *Environmental Monitoring and Assessment* 159: 99-110.
- 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. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 4954-4968.
- Dragun, Z., Filipović Marijić, V., Krasnići, N., Ivanković, D., Valić, D., Žunić, J., Kapetanović, D., Vardić Smrzlić, I., Redžović, Z., Grgić, I., Erk, M. (2018): Total and cytosolic concentrations of twenty metals/metalloids in the liver of brown trout *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758) from the karstic Croatian river Krka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 537-549.
- Dragun, Z., Tepić, N., Ramani, S., Krasnići, N., Filipović Marijić, V., Valić, D., Kapetanović, D., Erk, M., Rebok, K., Kostov, V., Jordanova, M. (2019): Mining waste as a cause of increased bioaccumulation of highly toxic metals in liver and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928). *Environmental Pollution* 247: 564-576.
- Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Redžović, Z., Erk, M. (2020): Comparison of intracellular trace element distributions in the liver and gills of the invasive freshwater fish species, Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch, 1782). *Science of the Total Environment* 730: 138923.
- Dragun, Z., Fiket, Ž., Stipaničev, D., Repec, S., Šošarić Vulić, Z., Ivanković, D., Krasnići, N., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Barac, F., Valić, D. (2021): Characterization of water and sediment quality of the lower course of the Mrežnica River: the effect of long-term historical contamination. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju - Abstracts of the 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation (CROTOX 2021)*, 72/1, str. 70.

- Dragun, Z., Ivanković, D., Krasnići, N., Kiralj, Z., Cvitanović, M., Karamatić, I., Valić, D., Barac, F., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Gjurčević, E., Matanović, K., Kužir, S. (2022a): Metal-binding biomolecules in the liver of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus, 1758): the first data for the family Esocidae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 257: 109327.
- 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. (2022b): Yesterday's contamination – a problem of today? The case study of discontinued historical contamination of the Mrežnica River (Croatia). *Science of the Total Environment* 848:157775.
- Duman, F., Kar, M. (2012): Temporal variation of metals in water, sediment and tissues of the European chub (*Squalius cephalus* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89: 428-433.
- Dutta, P., Biswas, P., Parui, D., Zaman, S., Mitra, A. (2019): Seasonal variations of heavy metals in *Oreochromis niloticus* collected from the north 24 Parganas district of West Bengal, India. *International Journal of Research and Analytical Reviews* 6: 75-78.
- Đikanović, V., Skorić, S., Gačić, Z. (2016): Concentrations of metals and trace elements in different tissues of nine fish species from the Meduvršje Reservoir (West Morava River Basin, Serbia). *Archives of Biological Sciences* 68: 811-819.
- Evensen, Ø. (2006): Liver. U: Ferguson, H. V. (ur.) *Systemic Pathology of Fish, A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*, 2. izdanje, London: Scotian Press, str. 200-217.
- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P. (1998): Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Marine Pollution Bulletin* 36: 509-518.
- Fiket, Ž., Roje, V., Mikac, N., Kniewald, G. (2007): Determination of arsenic and other trace elements in bottled waters by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Croatica Chemica Acta* 80: 91-100.
- Filipović Marijić, V., Raspor, B. (2007): Metal exposure assessment in native fish, *Mullus barbatus* L., from the Eastern Adriatic Sea. *Toxicology Letters* 168: 292-301.

- Foat, J., Quilichini, Y., Torres, J., Pereira, E., Spella, M. M., Mattei, J., Marchand, B. (2009): Comparison of arsenic and antimony contents in tissues and organs of brown trout caught from the river Presa polluted by ancient mining practices and from the river Bravona in Corsica (France): a survey study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 581-589.
- 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. *Environmental Earth Sciences* 76: 476.
- Giguère, A., Campbell, P. G. C., Hare, L., Couture, P. (2006): Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77: 178-189.
- Giri, S., Qiu, Z. (2016): Understanding the relationship of land uses and water quality in Twenty First Century: A review. *Journal of Environmental Management* 173: 41-48.
- Goncharova, I., Urbanova, M. (2009): Vibrational and electronic circular dichroism study of bile pigments: Complexes of bilirubin and biliverdin with metals. *Analytical Biochemistry* 392: 28-36.
- Goto, T., Takagi, S., Ichiki, T., Sakai, T., Endo, M., Yoshida, T., Ukawa, M., Murata, H. (2001): Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets: Relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. *Fisheries Science* 67: 58-63.
- Goto, D., Wallace, W. G. (2007): Interaction of Cd and Zn during uptake and loss in the polychaete *Capitella capitata*: whole body and subcellular perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352: 65-77.
- Has-Schön, E., Bogut, I., Strelec, I. (2006): Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 545-551.
- Has-Schön, E., Bogut, I., Rajković, V., Bogut, S., Čačić, M., Horvatić, J. (2008): Heavy metal distribution in tissues of six fish species included in human diet, inhabiting freshwaters of the Nature Park "Hutovo Blato" (Bosnia and Herzegovina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 75-83.

- Haubrock, P. J., Balzani, P., Johovic, I., Inghilesi, A. F., Nocita, A., Tricarico, E. (2018): The diet of the alien channel catfish *Ictalurus punctatus* in the River Arno (Central Italy). *Aquatic Invasions* 13: 575-585.
- HRN EN 14011 (2005): Fish Sampling by Electric Power [Uzorkovanje riba električnom strujom].
- Hršak, V., Leko, K., Trenc, N., Posavec Vukelić, V., Duplić, A. (2010.): Stručna podloga za zaštitu porječja rijeke Mrežnice.
- Hurley, R. R., Rothwell, J. J., Woodward, J. C. (2017): Metal contamination of bed sediments in the Irwell and Upper Mersey catchments, Northwest England: exploring the legacy of industry and urban growth. *Journal of Soils and Sediments* 17: 2648-2665.
- Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C. (1992): Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Marine Ecology Progress Series* 91: 89-96.
- Jacobsen, L., Engström-Öst, J. (2020): Coping with environments; Vegetation, turbidity and abiotics. U: Skov, C., Nilsson, A. (ur.) *Biology and Ecology of Pike*. Boca Raton: CRC Press, str. 32-61.
- Jakšić, G. (2018): Slatkovodne ribe Aquatike. Javna ustanova Aquatika - Slatkovodni Akvarij Karlovac, Karlovac.
- Jia, Y., Wang, L., Qu, Z., Wang, C., Yang, Z. (2017): Effects on heavy metal accumulation in freshwater fishes: species, tissues, and sizes. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 9379-9386.
- Jordanova, M., Rebok, K., Dragun, Z., Ramani, S., Ivanova, L., Kostov, V., Valić, D., Krasnići, N., Filipović Marijić, V., Kapetanović, D. (2016): Histopathology investigation on the Vardar chub (*Squalius vardarensis*) populations captured from the rivers impacted by mining activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129: 35-42.
- Kamunde, C., MacPhail, R. (2008): Bioaccumulation and hepatic speciation of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic waterborne copper exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 493-503.
- Klaassen, C. D., Liu, J., Choudhuri, S. (1999): Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 267-294.

- Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B. (2013): Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 20: 2340-2351.
- Krasnići, N. (2019): Raspodjela odabranih metala među citosolskim biomolekulama škrge i jetre klenova (*Squalius cephalus* (Linnaeus) i *Squalius vardarensis* Karaman; Actinopterygii, Cyprinidae) iz rijeka onečišćenih metalima. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U. T. (2008): Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology* 129: 389-406.
- Langston, W. J., Chesman, B. S., Burt, G. R., Pope, N. D., McEvoy, J. (2002): Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Marine Environmental Research* 53: 263-293.
- Lapointe, D., Couture, P. (2009): Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 571-580.
- Lapointe, D., Gentes, S., Ponton, D. E., Hare, L., Couture, P. (2009): Influence of prey type on nickel and thallium assimilation, subcellular distribution and effects in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology* 43: 8665-8670.
- Le Louarn, H., Cloarec, A. (1996): Insect predation on pike fry. *Journal of Fish Biology* 50: 366-370.
- Liu, J. L., Xu, X. R., Ding, Z. H., Peng, J. X., Jin, M. H., Wang, Y. S., Hong, Y. G., Yue, W. Z. (2015): Heavy metals in wild marine fish from South China Sea: levels, tissue- and species-specific accumulation and potential risk to humans. *Ecotoxicology* 24: 1583-1592.
- Lobinski, R., Marczenko, Z. (1997): Spectrochemical trace analysis for metals and metalloids. U: Weber, S. G. (ur.) *Wilson and Wilsons Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 30. Amsterdam: Elsevier.
- Łuczyńska, J., Paszczyk, B., Łuczyński, M. J. (2019): Determination of cadmium in muscles and liver of freshwater fish species from Mazurian Lake District, and risk assessment of fish consumption (Poland). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 19, 935-945.

- Maita, M., Aoki, H., Yamagata, Y., Watanabe, K., Satoh, S., Watanabe, T. (1997): Green liver observed in yellowtail fed non-fish meal diet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 63: 400-401.
- Mason, A. Z., Jenkins, K. D. (1995): Metal detoxification in aquatic organisms. U: Tessier, A., Turner, D. (ur.) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Chichester: J. Wiley & Sons, str. 479-608.
- Matouke, M. M., Mustapha, M.,K. (2020): Growth and metabolism of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fed with copepods (*Eucyclops* sp.) exposed to lead and titanium dioxide nanoparticles. *African Journal of Aquatic Science* 45: 310-316.
- McGeer, J. C., Niyogi, S., Smith, D. S. (2012): Cadmium. U: Wood, M., Farrell, A. P., Brauner, C. J. (ur.), *Homeostasis and Toxicology of Non-essential Metals*, Fish physiology series, vol. 31B. Amsterdam: Elsevier, str. 125-184.
- Mijošek, T., Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Ivanković, D., Krasnići, N., Redžović, Z., Erk, M. (2021): Intestine of invasive fish Prussian carp as a target organ in metal exposure assessment of the wastewater impacted freshwater ecosystem. *Ecological Indicators* 122: 107247.
- Miller, P. A., Munkittrick, K. R., Dixon, D. G. (1992): Relationship between concentrations of copper and zinc in water, sediment, benthic invertebrates, and tissues of white sucker (*Catostomus commersoni*) at metal-contaminated sites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 978-984.
- Mims, M. P., Prchal, J. F. (2005): Divalent metal transporter 1. *Hematology* 10: 339-345.
- Monna, F., Camizuli, E., Revelli, P., Biville, C., Thomas, C., Losno, R., Scheifler, R., Bruguier, O., Baron, S., Chateau, C., Ploquin, A., Alibert, P. (2011): Wild brown trout affected by historical mining in the Cévennes National Park, France. *Environmental Science & Technology* 45: 6823-6830.
- Nikolić, D., Skorić, S., Janković, S., Hegediš, A., Djikanović, V. (2021): Age-specific accumulation of toxic metal(loid)s in northern pike (*Esox lucius*) juveniles. *Environmental Monitoring and Assessment* 193: 229.
- NN 55 (2013): Ordinance on the Protection of Animals Used for the Scientific Purposes [Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe].

- O'Dell, B. L., Sunde, R. A. (1997): Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. New York: Marcel Dekker Inc.
- Olsson, P., Kling, P., Hogstrand, C. (1998): Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. U: Langston, W. J., Bebianno, M. J. (ur.) Metal Metabolism in Aquatic Environments. London: Chapman & Hall, str. 321-350.
- Omrčen, E. (2022): Biomarkerski odgovori i akumulacija metala u mišićima štuke (*Esox lucius*) iz rijeke Mrežnice kao pokazatelji onečišćenja vode. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Otitoloju, A. A. (2002): Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var. *radula* (L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 404-415.
- Playle, R. C. (1998): Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment* 219: 147-163.
- Podrug, M., Raspor, B., Erk, M., Dragun, Z. (2009): Protein and metal concentrations in two fractions of hepatic cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). *Chemosphere* 75: 843-849.
- Rajkowska, M., Protasowicki, M. (2013): Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophy in Northwestern Poland. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 3493-3502.
- Rakovčević, J., Suković, D., Marić, D. (2018): Distribution and relationships of eleven trace elements in muscle of six fish species from Skadar Lake (Montenegro). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 647-657.
- Rašković, B., Poleksić, V., Skorić, S., Jovičić, K., Spasić, S., Hegediš, A., Vasić, N., Lenhardt, M. (2018): Effects of mine tailing and mixed contamination on metals, trace elements accumulation and histopathology of the chub (*Squalius cephalus*) tissues: evidence from three differently contaminated sites in Serbia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 153: 238-247.
- Robbe, D. (1984): Interpretation des teneurs en elements metalliques associes aux sediments. Rapport des laboratoires, serie: environnement et genie urbain, EG-1.

- Rosabal, M., Pierron, F., Couture, P., Baudrimont, M., Hare, L., Campbell, P. G. (2015): Subcellular partitioning of non-essential trace metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, Tl) in livers of American (*Anguilla rostrata*) and European (*Anguilla anguilla*) yellow eels. *Aquatic Toxicology* 160: 128-141.
- Sakaguchi, H., Hamaguchi, A. (1979): Physiological studies on cultured red sea bream, 4: Prevention of green liver and changes in plasma constituents and enzymatic activities on winter cultured in warm water. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45: 1371-1373.
- Samecka-Cymerman, A., Kepmers, A. J. (2007): Heavy metals in aquatic macrophytes from two small rivers polluted by urban, agricultural and textile industry sewages SW Poland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 198-206.
- Sammons, S. M., Scalet, C. G., Neumann, R. M. (1994) Seasonal and size-related changes in the diet of northern pike from a Shallow Prairie Lake. *Journal of Freshwater Ecology* 9: 321-329.
- Sampath, W. W. H. A., Rathnayake, R. M. D. S., Yang, M., Zhang, W., Mail, K. (2020): Roles of dietary taurine in fish nutrition. *Marine Life Science and Technology* 2: 360-375.
- Shi, R., Zhao, J., Shi, W., Song, S., Wang, C. (2020): Comprehensive assessment of water quality and pollution source apportionment in Wuliangsuhai Lake, Inner Mongolia, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17: 5054.
- Skoric, S., Visnjic-Jeftic, Z., Jaric, I., Djikanovic, V., Mickovic, B., Nikcevic, M., Lenhardt, M. (2012): Accumulation of 20 elements in great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and its main prey, common carp (*Cyprinus carpio*) and Prussian carp (*Carassius gibelio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 244-251.
- Sorenson, E. M. B. (1991): Arsenic. U: Sorenson, E. M. B. (ur.) *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press, str. 61-99.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Višnjić-Jeftić, Ž., Gačić, Z., Lenhardt, M., Vasić, N., Vuković-Gačić, B. (2016): Assessment of status of three water bodies in Serbia based on tissue metal and metalloid concentration (ICP-OES) and genotoxicity (comet assay). *Environmental Pollution* 213: 600-607.

- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Munasinghe, D. M. S., Endo, M., Matsumoto, T., Sakurai, A., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H., Ukawa, M., Kuramoto, T. (2005): The green liver syndrome is caused by taurine deficiency in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* fed diets without fishmeal. *Aquaculture Science* 53: 279-290.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Endo, M., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H., Ukawa, M. (2006): Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Science* 72: 1191-1199.
- Tekin-Özan, S., Kir, I. (2006): Concentrations of some heavy metals in organs of two fish species from the Beysehir Lake, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin* 15: 530-534.
- Van Campenhout, K., Infante, H. G., Goemans, G., Belpaire, C., Adams, F., Blust, R., Bervoets, L. (2008): A field survey of metal binding to metallothionein and other cytosolic ligands in liver of eels using an on-line isotope dilution method in combination with size exclusion (SE) high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry (ICP-TOF MS). *Science of the Total Environment* 394: 379-389.
- Vijayakumar, B. (1987): Relationship between water, lipid and protein in the muscle, liver and gonad in a freshwater fish *Puntius filamentosus* (Val.). *Fishery Technology* 24: 75-76.
- Wallace, W. G., Lee, B.-G., Louma, S. N. (2003): Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249: 183-197.
- Wicklund, A., Runn, P. (1988): Calcium effects on cadmium uptake, redistribution and elimination in minnows, *Phoxinus phoxinus*, acclimated to different calcium concentrations. *Aquatic Toxicology* 13: 109-122.
- Wiener, J. G., Giesy Jr., J. P. (1979): Concentrations of Cd, Cu, Mn, Pb and Zn in fishes in a highly organic softwater pond. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36: 270-279.
- Yi, Y. J., Zhang, S. H. (2012): Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 3989-3996.

Zamora-Ledezma, C., Negrete-Bolagay, D., Figueroa, F., Zamora-Ledezma, E., Ni, M., Alexis, F., Guerrero, V. H. (2021): Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. *Environmental Technology & Innovation* 22: 101504.

Internetski izvori:

Duga Resa. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021). <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=16496> (pristupljeno 6. 3. 2022.).

Grad Duga Resa, Službene stranice – Povijest grada (2022) <https://dugaresa.hr/povijest-grada/> (pristupljeno 4.1.2022.).

IUCN (2011) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 3.1. <https://www.iucnredlist.org/species/135631/133427422#geographic-range> (pristupljeno 2.11.2021.).

Maradin M. Mrežnica – važnost rijeke u kršu. *Geografija.hr* (2007) <https://geografija.hr/528/> (pristupljeno 3.12.2021.).

Pike Caster. Pike Spawning Season: Everything You Need To Know: (2018). <https://pikecaster.com/pike-spawning-season-when-where/> (pristupljeno 7. 4. 2022.).

Povijest hrvatske industrije: Pamučna industrija Duga Resa, poduzeće za proizvodnju tekstila i odjeće u Dugoj Resi (2020). *Kemija u industriji*, vol. 69, br. 3-4: 225-226. <https://hrcak.srce.hr/236737> (pristupljeno 5.2.2022.).

USFWS National Digital Library (2018) <https://digitalmedia.fws.gov/digital/collection/natdiglib/id/28739/rec/20> (pristupljeno 1.10.2021.).

9. ŽIVOTOPIS

Marita Cvitanović pohađala je Osnovnu školu Matka Laginje u Zagrebu od 2002. do 2010. godine. Potom je upisala II. opću gimnaziju u Zagrebu te se 2011. godine preselila u Švicarsku i u Zürichu pohađala International School Zürich North. Od 2013. godine nastavlja školovanje u Hrvatskoj, u X. dvojezičnoj općoj gimnaziji u Zagrebu. Godine 2014. upisuje preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Titulu sveučilišne prvostupnice struke znanosti o okolišu stječe 2019. godine nakon čega, na istom fakultetu, upisuje diplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu. Dva puta je obavljala funkciju demonstratora na kolegiju „Praktikum iz Protista“ (2015./2016. i 2016./2017. godine) te jednom na praktikumu iz kolegija „Biologija Mora“ (2017./2018. godine). Predstavljala je Biološki odsjek na Smotri sveučilišta 2018., 2019. i 2021. godine. Bila je studentska predstavica od 2017. do 2020. godine, za što je dobila zahvalu za vrijedan doprinos u uključivanju studentskih ideja i stavova u rad Biološkog odsjeka od sadašnje pročelnice biološkog odsjeka prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac. Uz pomoć kolega Ive Čupić i Jana Regula napisala je i provela projekt “Inventarizacija pauka otoka Krka” pod pokroviteljstvom Studentskog zbora PMF-a 2018. godine. Sudjelovala je na znanstvenom skupu “Central European Genome Stability and Dynamics Meeting Zagreb, Croatia” 2016. godine, “Noći biologije” 2016. i 2017. godine te na konferenciji “9th ESEH Biennial Conference Zagreb, Croatia” 2017. godine. Sudjelovala je na 1. Studentskom kongresu okolišnog zdravlja u Rijeci 2017. godine s usmenim izlaganjem i posterom na temu okolišnih problema Plitvičkih jezera. Bila je predsjednica organizacijskog odbora Petog simpozija studenata bioloških usmjerenja (*SiSB5*) 2019. godine, kao i članica organizacijskog odbora 2. Studentskog kongresa okolišnog zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem u Rijeci (2018.) te organizacijskog odbora projekta Prvi dan karijere PMF-a (*WISe*). U potonjem projektu bila je zadužena za organizaciju okruglih stolova svakoga odsjeka PMF-a te je predstavila projekt na programu Z1 (2018.). Za navedeni je projekt, zajedno s ostalim kolegama, osvojila Rektorovu nagradu za 2019. godinu. Na Ljetnoj Tvornici Znanosti (znanstvene radionice za osnovnoškolce i srednjoškolce) bila je mentor učenicima 5. i 6. razreda osnovnih škola (2018.). Svoje je iskustvo predstavila u emisiji “Dobro Jutro, Hrvatska”. Koristi tri strana jezika (engleski, španjolski i njemački), a tečno govori engleski te ima položenu B2 razinu. Osvojila je tri medalje u veslanju za PMF, na Sveučilišnoj utrci 2015. i 2016. godine te na ergometrijadi Veslačkog kluba Trešnjevka 2022. godine. U sklopu BIUS-a (udruge studenata Biologije)

sudjelovala je na nizu terena: „Insula Tilagus“ na Dugom otoku 2017. godine (u svibnju sa sekcijom Biologija mora, a u rujnu sa sekcijom Pauci); na Zlarinu 2018. godine (u svibnju s Paucima, a u rujnu s Mekušcima); te na Žumberku 2019. i 2020. godine (sa sekcijama Mekušci i Ribe). U časopisu studenata udruge BIUS (“*In Vivo*”) objavila je jedan članak 2018. i tri članka 2019. godine. Sa Sekcijom za sisavce, godine 2018. sudjelovala je na projektu “Tko je ukrao mlade capybara-e?” u Zoološkom vrtu, Zagreb. Na projektu su se skupljale korisne slike sisavaca snimljene fotozatkama. Sudjelovala je u istraživačkom projektu “Endemi Like” kroz koji se istražuje ihtiofauna ličkih potoka i rijeka u studenom 2020. Bila je članica Nadzornog odbora BIUS-a u akademskoj godini 2017./2018. Pomagala je u čišćenju obale u Zadru i na Dugom otoku (plaža Sakarun) sa sekcijom Biologija mora i Društvom istraživača mora 2000 milja. Sudjelovala je u radionici recikliranja papira u osnovnim školama za BIUS Edukacijsku sekciju. Tijekom pisanja diplomskog rada postala je koautorica na jednom znanstvenom radu i jednom sažetku u Zborniku s međunarodnog znanstvenog skupa.

Objavljeni znanstveni radovi:

Dragun, Z., Ivanković, D., Krasnići, N., Kiralj, Z., Cvitanović, M., Karamatić, I., Valić, D., Barac, F., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Gjurčević, E., Matanović, K., Kužir, S. (2022): Metal-binding biomolecules in the liver of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus, 1758): the first data for the family Esocidae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 257: 109327.

Objavljeni stručni radovi:

Cvitanović, M. (2019): Projekt WISe. *In Vivo* 23: 96-99.

Cvitanović, M. (2019): Ljubav za LJTZ! *In Vivo* 23: 100-104.

Cvitanović, M. (2019): TRAPPIST-1 sustav. *In Vivo* 23: 143-146.

Cvitanović, M., Šunić, I. (2019): SiSB5, Peti simpozij studenata bioloških usmjerenja. *In Vivo* 24: 114-115.

Rad nagrađen rektorovom nagradom:

Babić, L., Behtanić, M., Cader, M., Cvitanović, M., Čavka, I., Čiček, M., Duvnjak, M., Ercegovac, A., Franov, S. M., Hadžić, E., Herceg, M., Horvat Velić, E., Katić, R., Keršić, I., Krizmanić, A., Ladišić, A., Lisak, G., Lukić, R., Mateša, K., Mihaljević, M., Miočić-

Stošić, F., Pakasin, T., Perić, M., Rumbak, D., Sočo, P., Stanić, P., Šanjek, R., Šibenik, T., Toplek, Ž., Vasilisk, V., Vojković, F., Vukoja, D., Zaninović, J., Zukon Kolić, E., Željeznjak, I. V. (2019): Dan Karijera – Workin' Science. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Sažetci u zbornicima skupova:

Cvitanović, M. (2017): Problemi Nacionalnog parka Plitvička jezera. 1. Studentski kongres okolišnog zdravlja - Knjiga sažetaka, Špoljarić, N., Bartoš, K., Katušin, M. (ur.), Fakultetski odbor svih studenata Medicinskog fakulteta u Rijeci, Rijeka, str. 24-25.

Mijošek, T., Ivanković, D., Kralj, Z., Cvitanović, M., Valić, D., Barac, F., Filipović Marijić, V., Gjurčević, E., Matanović, K., Kužir, S., Dragun, Z. (2021): Multibiomarker responses in the liver of the northern pike (*E. lucius*) from the Mrežnica River as an indication of water contamination. 21st European Meeting on Environmental Chemistry – Book of Abstracts, Ivančev-Tumbas, I., Beškoski, V.P., Šajnović, A. (ur.), Serbian Chemical Society, Beograd, str. 151.