

# Biološki pokazatelji izloženosti metalima u potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke

---

Redžović, Zuzana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:586668>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prirodoslovno-matematički fakultet**

**Biološki odsjek**

**Zuzana Redžović**

**Biološki pokazatelji izloženosti metalima u potočne  
pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) iz rijeke Krke**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2017.**

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

*Najiskrenije se zahvaljujem svojim dragim mentoricama dr. sc. Vlatki Filipović Marijić s Instituta Ruđer Bošković i izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner s Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu na pruženoj prilici za izradu ovog rada, velikoj pomoći prilikom provođenja istraživanja, pisanja rada i interpretacije rezultata. Hvala vam na velikoj požrtvornosti, susretljivosti, izdvojenom vremenu i neizmjernej strpljivosti.*

*Također veliko hvala članovima Laboratorija za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković na gostoprimstvu i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Posebno zahvaljujem dr. sc. Zrinki Dragun iz Laboratorija za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković na pomoći oko mjerenja koncentracija metala za potrebe ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem se i članovima Laboratorija za biološke učinke metala i Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama Instituta Ruđer Bošković na pomoći u terenskim istraživanjima na rijeci Krki.*

*Zahvaljujem Zakladi Adris koja je omogućila financiranje i provođenje projekta „Procjena kakvoće vodotoka rijeke Krke i potencijalne opasnosti za Nacionalni park Krka primjenom novih bioindikatora i biomarkera“, voditeljice dr. sc. Vlatke Filipović Marijić, u okviru kojeg je provedeno ovo istraživanje.*

*Hvala svim dragim prijateljima za sve one divne zajedničke trenutke tijekom studija te za nezaboravne BIUS-ove terene na kojima sam stekla mnogobrojna nova iskustva i prijateljstva.*

*Hvala od srca cijeloj mojoj obitelji, najviše roditeljima jer su mi omogućili da studiram ono što najviše volim, pružili mi neizmjernu ljubav i podršku u svakom trenutku. Mojoj najdražoj seki veliko hvala što je uvijek uz mene i gura me u nove izazove kad ja za to nemam hrabrosti.*

*Ovaj rad posvećujem svojoj seki, mami i tati.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## **BIOLOŠKI POKAZATELJI IZLOŽENOSTI METALIMA U POTOČNE PASTRVE (*SALMO TRUTTA* LINNAEUS, 1758) IZ RIJEKE KRKE**

Zuzana Redžović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zahvaljujući sedrenim barijerama te brojnim slapištima i jezerima, rijeka Krka je 1985. godine proglašena nacionalnim parkom. U području grada Knina neadekvatno pročišćene komunalne i tehnološke otpadne vode bi mogle ugroziti živi svijet i fenomen sedrenih barijera, budući se ispuštaju samo 2 km uzvodno od granice parka. Njihov utjecaj procijenjen je na kakvoću vode i na ribe, potočnu pastrvu (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) na šest postaja uz grad Knin te izvoru rijeke Krke kao kontrolnoj postaji. Fizikalno-kemijski čimbenici ukazuju na pogoršanje kakvoće vode kod grada Knina. Koncentracije većine metala u vodi i staničnom citosolu jetre riba su povišene uz ispuste otpadnih voda u odnosu na izvor. Biomarkeri, rani biopokazatelji zagađenja (metalotioneini, ukupni citosolski proteini), ne potvrđuju značajne stanične promjene u riba iz toka kod grada Knina. Prikazani rezultati ukazuju na potencijalnu opasnost za očuvanje staništa u Nacionalnom parku Krka te je neophodno provoditi sustavni monitoring i praćenje kakvoće vode rijeke Krke.

(75 stranica, 17 slika, 3 tablice, 98 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: otpadne vode, biomonitoring, citosolski metali, metalotioneini, ukupni citosolski proteini

Voditelj: Vlatka Filipović Marijić, dr. sc.

Suvoditelj: Jasna Lajtner, izv. prof. dr. sc.

Ocjenitelji: Jasna Lajtner, izv. prof. dr. sc.

Božena Mitić, prof. dr. sc.

Sofia Ana Blažević, doc. dr. sc.

Rad prihvaćen: 15.9.2017.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

## **BIOLOGICAL INDICATORS OF METAL EXPOSURE IN THE BROWN TROUT (*SALMO TRUTTA* LINNAEUS, 1758) FROM THE KRKA RIVER**

Zuzana Redžović

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Thanks to the travertine barriers and many cascades and lakes, Krka River was proclaimed National Park in 1985. Near Town of Knin, municipal and industrial wastewaters may threaten living world and tufa barriers, since they are released without proper purification only 2 km upstream of the park border. Their influence on the water quality and on fish, brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) was evaluated on six locations near the Town of Knin and Krka source, as reference location. Physico-chemical water parameters pointed to deteriorated water quality at anthropogenically impacted locations. Levels of the most metals in the water and fish hepatic cytosol were increased near the wastewater outlets compared to the Krka source. Biomarkers, early warning signs of pollution (metallothioneins, total cytosolic proteins), did not confirm significant changes at the cellular level in fish from the watercourse near Knin. Presented results indicated potential threat to the habitat preservation in the Krka National Park. Therefore, implementation of water quality monitoring strategies of the Krka River is required.

(75 pages, 17 figures, 3 tables, 98 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: wastewaters, biomonitoring, cytosolic metals, metallothioneins, total cytosolic proteins

Supervisor: Dr. Vlatka Filipović Marijić

Cosupervisor: Dr. Jasna Lajtner, Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Thesis accepted: 15<sup>th</sup> of September 2017

# Sadržaj

1	UVOD .....	1
1.1	Slatkovodni ekosustavi i njihovo očuvanje .....	1
1.2	Krške rijeke u Hrvatskoj .....	1
1.2.1	Zaštita podzemnih voda dalmatinskih slivova .....	2
1.3	Procjena kakvoće voda .....	3
1.4	Metali u riječnim ekosustavima .....	3
1.5	Metali u vodenim organizmima .....	5
1.6	Biomonitoring i biomarkeri .....	6
1.6.1	Metalotioneini .....	7
1.6.2	Ukupni citosolski proteini .....	9
1.7	Cilj istraživanja .....	10
2	PODRUČJE ISTRAŽIVANJA .....	11
2.1	Rijeka Krka .....	11
2.2	Uzorkovanje .....	14
3	MATERIJALI I METODE .....	17
3.1	Indikatorski organizam - potočna pastrva .....	17
3.2	Određivanje biometrijskih parametara riba .....	18
3.3	Mjerenje fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode .....	19
3.4	Određivanje koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi .....	20
3.5	Obrada tkiva jetre u svrhu određivanja koncentracija citosolskih metala i staničnih biomarkera .....	22
3.6	Određivanje koncentracija metala u staničnom citosolu jetre potočne pastrve ....	23
3.7	Određivanje staničnih biomarkera .....	23
3.7.1	Određivanje koncentracije metalotioneina .....	23
3.7.2	Određivanje koncentracije ukupnih citosolskih proteina .....	25
3.8	Statistička obrada podataka .....	26
4	REZULTATI .....	27
4.1	Fizikalno-kemijski čimbenici kakvoće vode .....	27
4.2	Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke .....	30
4.3	Biometrijski pokazatelji jedinki potočne pastrve .....	36
4.4	Koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve .....	38
4.5	Biomarkeri .....	43

4.5.1	Koncentracije metalotioneina .....	44
4.5.2	Koncentracije ukupnih citosolskih proteina .....	45
5	RASPRAVA .....	46
5.1	Procjena kakvoće vode s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike .....	47
5.1.1	Temperatura vode .....	47
5.1.2	Zamućenje vode.....	48
5.1.3	pH i oksido-redukcijski potencijal.....	49
5.1.4	Alkalitet .....	50
5.1.5	Ukupno otopljene soli i vodljivost .....	50
5.1.6	Otopljeni ugljični dioksid, karbonatna i ukupna tvrdoća vode.....	50
5.1.7	Režim kisika .....	51
5.1.8	Hranjive tvari.....	52
5.2	Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke .....	54
5.3	Biološke promjene u potočnoj pastrvi .....	57
5.3.1	Koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve .....	59
5.3.2	Biomarkeri .....	60
6	ZAKLJUČAK .....	63
7	LITERATURA.....	64
8	ŽIVOTOPIS .....	75



## POPIS KRATICA

BAM	eng. <i>Bioaccumulation Monitoring</i> , bioakumulacijski monitoring
BEM	eng. <i>Biological Effects Monitoring</i> , biološki monitoring
BSA	eng. <i>bovine serum albumin</i>
CM	eng. <i>Chemical Monitoring</i> , kemijski monitoring
°dH	njem. <i>Deutsche Härte</i> , njemački stupnjevi tvrdoće vode
DOC	eng. <i>Dissolved Organic Carbon</i> , otopljeni organski ugljik
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EM	eng. <i>Environmental Monitoring</i> , monitoring ekosustava
FAU	eng. <i>formazine attenuation units</i>
HM	eng. <i>Health Monitoring</i> , zdravstveni monitoring
HR ICP-MS	eng. <i>High Resolution Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> , maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom
GSH	reducirani glutation
IUCN	eng. <i>International Union for Conservation of Nature</i> , Međunarodni savez za očuvanje prirode
KPK	kemijska potrošnja kisika
KT	karbonatna tvrdoća vode
LEU	leupeptin
MS-222	metan-sulfonat-metaamino-etilester benzojeva kiselina, anestetik
MT	metalotionein
ORP	oksidoredukcijski potencijal
PMSF	fenil-metilsulfonil-fluorid
S.D.	standardna devijacija
TDS	eng. <i>total dissolved solids</i> , ukupno otopljene
UT	ukupna tvrdoća vode
WFD	eng. <i>Water Frame Directive</i> , Okvirna direktiva o vodama

# 1 UVOD

## 1.1 Slatkovodni ekosustavi i njihovo očuvanje

Slatkovodni ekosustavi imaju vrlo važnu ulogu u očuvanju života na Zemlji te je stoga bitna njihova zaštita i njihovo održivo korištenje kao prirodnih resursa. Riječni ekosustavi osiguravaju golemi raspon usluga i predstavljaju ekonomsku, estetsku i kulturnu vrijednost. Međutim, rijeke ne predstavljaju samo uporabno dobro, nego su one vrijedno blago koje osigurava osnovni preduvjet života te se stoga često nazivaju „ekološkim arterijama“ krajolika (Bunn, 2002). Unatoč tome, veliki postotak slatkovodnih ekosustava je degradiran pod utjecajem čovjeka. Jedan od najčešćih uzroka ugroženosti rijeka, a time i njihovog živog svijeta je zagađenje voda. Ono potječe iz točkastih (pojedinačnih) izvora poput kanalizacijskih cijevi ili iz raspršenih, kao što su gnojivo i pesticidi s polja. S otpadnim vodama iz gradova i industrijskih postrojenja u rijeke ulaze različite onečišćujuće tvari, poput metala, lužina, goriva i drugih štetnih tvari.

U današnje vrijeme važnost zaštite i očuvanja rijeka u prirodnom stanju nastoji se unijeti i u zakonodavstvo. Temeljna strategija upravljanja vodama zapisana je u Okvirnoj direktivi o vodama (WFD, eng. *Water Frame Directive*). Namijenjena je očuvanju rijeka, odnosno održivom upravljanju rijekama. Osim očuvanja, temelj ove direktive je i vraćanje rijeka ili njihovih dijelova u prvobitno stanje. Gospodarenje i zaštita podzemnih voda i površinskih tokova od negativnih utjecaja i aktivnosti u Hrvatskoj, regulirano je Zakonom o vodama (NN 153/2009 i 130/2011). Sukladno Zakonu o vodama, nadzor nad stanjem površinskih, priobalnih voda te podzemnih voda provodi se sustavnim praćenjem stanja voda (monitoring) u svrhu utvrđivanja nastalih promjena.

## 1.2 Krške rijeke u Hrvatskoj

Dinarski krš je karakterističan tip krajolika koji se proteže preko Dinarskog gorja, u smjeru sjeverozapad-jugoistok. Ovo područje ima površinu od oko 60 000 km<sup>2</sup> i jedno je od najvećih kontinuiranih krških područja Europe. Proteže se od rijeke Soče u Italiji, preko Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne gore i djela jugozapadne Srbije, do sjeverozapadne Albanije. Osim njegove raznolike i kompleksne geologije, hidrologija dinarskog krša je jedan od njegovih najosebujnijih i najvažnijih elemenata (Mihevc i sur., 2010). Na teritoriju Hrvatske protječu brojne krške rijeke, poput Zrmanje, Krke, Cetine, Kupe, Une,

Korane, Mrežnice, Dobre te ponornica Gacke i Like, koje imaju ključnu ulogu u nastajanju i razvoju krških fenomena. Mnoge naše krške rijeke imaju ujezerene dijelove toka s razvijenom močvarnom vegetacijom, koja predstavlja stanište brojnim životinjama. Dalmatinske krške rijeke usječene su u duboke kanjone, a njihovo glavno geološko obilježje su sipari, odnosno padine kanjona obložene kamenim blokovima i kamenjem koje se proteže od vrha do dna kanjona.

Hidrološke specifičnosti krša su brzo upijanje oborina, mala sposobnost akumulacije u zoni sitnih pukotina te velika provodnost i stvaranje povremenih površinskih i podzemnih akumulacija u zonama krupnih pukotina. Posljedica ovakvih karakteristika je da slivovi ili njihovi dijelovi izgrađeni od karstificiranih karbonatnih stijena, imaju slabo razvijenu mrežu površinskih vodotoka. Zbog složenih odnosa podzemnih i nadzemnih dijelova svojega toka, krške su rijeke izuzetno osjetljive i na najmanje oblike onečišćenja. Onečišćena voda se kroz krševit teren nekontrolirano i brzo procjeđuje u podzemlje te napreduju prema izvorima iz kojih se kaptira podzemna voda za potrebe vodoopskrbe.

### **1.2.1 Zaštita podzemnih voda dalmatinskih slivova**

Prirodni sastav krških podzemnih voda vodnog područja Dalmatinskih slivova, posebice u unutrašnjosti Dalmacije, izuzetne je kakvoće, što omogućava njegovu upotrebu u vodoopskrbi (Nakić, 2000). Upravo zbog specifičnosti i velike osjetljivosti krškog terena potrebno je voditi više računa o zaštiti nego u ravničarskim područjima. Neadekvatno upravljanje otpadom, loš sustav zaštite okoliša, nepostojanje adekvatnih sustava odvodnje komunalnih i otpadnih voda (brojne tzv. „crne jame“) predstavljaju prijetnju prirodnim bogatstvima dalmatinskih porječja. U dalmatinskim županijama najveći problem je nedostatak odgovarajuće vodoopskrbne i vodovodne infrastrukture za podupiranje pravilnog sustava zaštite podzemnih voda. Nakić (2000) je analizama podzemnih voda u Hrvatskoj utvrdio da je na 77 % crpilišta u kršu barem jednom nađena pojava zagađenja. Jedan od načina veće kontrole i zaštite krških podzemnih voda zasigurno je usklađivanje i donošenje mnogobrojnih pravilnika i zakona te kontinuirana terenska ispitivanja i kontrola vodnih područja Hrvatske, ali i podizanje svijesti građana o kompleksnosti i osjetljivosti sustava podzemnih voda u kršu te načinu njihove zaštite (Lončar, 2002).

### 1.3 Procjena kakvoće voda

Količina i kakvoća vode bitan su pokazatelj ljudskih utjecaja. Prema načelu održivog razvoja potrebno je aktivno provoditi zaštitu i procjenu kakvoće voda kako bi se zadržalo njihovo dobro ekološko stanje. Vode bi trebale zadržati svojstvo samopročišćavanja, što je moguće samo ukoliko ljudski utjecaj nije značajan (Tušar, 2004).

U svrhu procjene kakvoće voda, donesena je Uredba o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) u kojoj su definirani elementi ocjene ekološkog stanja rijeka, u koje od osnovnih fizikalno-kemijskih elemenata spadaju režim kisika, zakiseljenost i hranjive tvari te su navedene granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za određene pokazatelje. Također, definirane su i granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za biološke elemente (fitoplankton, fitobentos, makrofiti, makrozoobentos i ribe) te za specifične onečišćujuće tvari (arsen, bakar, cink, krom, fluoridi, organski vezani halogeni i poliklorirani bifenili). Kao što se navodi u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) kategorije ekološkog stanja tijela površinske vode na temelju osnovnih fizikalno-kemijskih elemenata mogu biti vrlo dobro, dobro ili umjereno stanje.

Među onečišćujućim tvarima posebna pozornost se posvećuje metalima jer za razliku od organske tvari nisu biorazgradivi te jednom uneseni u ekosustav u njemu i ostaju. Metali mogu promijeniti kemijski oblik te postati manje toksični, ali se iz biogeokemijskog kruženja ne mogu ukloniti, što u konačnici može dovesti i do povećane akumulacije toksičnih metala u vodenim organizmima (Sadiq, 1992).

### 1.4 Metali u riječnim ekosustavima

Vrlo važan parametar u procjeni stanja kakvoće prirodnih voda je sadržaj tragova metala (Branica, 1990; Tesseier i Turner, 1995). Budući su prirodne koncentracije prijelaznih metala u rijekama niske ( $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), što odražava i naziv „metali u tragovima“, svaki dodatni unos utječe na njihovu koncentraciju i time mijenja prirodnu ravnotežu u vodenim ekosustavima (Riley i Chester, 1971). Metali su u vodenim okolišima uvijek prirodno prisutni, a njihova prirodna koncentracija je regulirana procesima kao što je razaranje stijena i tla pod utjecajem vanjskih sila te njihovo ispiranje oborinskim vodama ili raznošenje vjetrom. Prirodne koncentracije metala u velikoj mjeri ovise o mineralnom sastavu tla na kojem se nalaze. Antropogeni unos metala najlakše je uočiti u

područjima kod kojih je poznata njihova prirodna koncentracija. Zbog toga je za procjenu stanja riječnih tokova važno pratiti koncentracije metala od samog izvora (Omanović i sur., 2005). Štetni utjecaj čovjeka na okoliš u znatnoj je mjeri povećan uslijed industrijalizacije i uporabe metala u raznim granama suvremene proizvodnje što ima za posljedicu svakodnevno izlaganje teškim metalima te poremećaj biogeokemijskog ciklusa metala (Scoullous i sur., 2005).

Količina i raspodjela metala u vodi određena je njihovom fizikalno-kemijskom reaktivnošću, odnosno stupnjem postignutih ravnoteža te antropogenim i biogeokemijskim izvorima (Branica, 1999). Promjenom fizikalno-kemijskih uvjeta moguća je promjena kemijskog oblika metala, a time i njihove toksičnosti. Toksičnost metala se smanjuje reakcijama taloženja i kompleksiranja (Sadiq, 1992). Najčešće otopljene oblike metala čine organski kompleksirani metali i anorganski oblici metala. Stvaranjem kompleksa metala i organskih liganada smanjuje se biološka raspoloživost metala, a zbog relativno velike veličine kompleksa, metalima je onemogućen prolaz kroz staničnu membranu (Gaillardet i sur., 2004), dok su kompleksi s anorganskim ligandima većinom vrlo labilni i brzo disociraju u vodi te je takva frakcija metala uglavnom raspoloživa živim organizmima (Dragun, 2006).

Od velikog broja onečišćujućih tvari koje ljudskom djelatnošću dospijevaju u okoliš, jednu od najvažnijih uloga imaju metali, posebice teški metali. Značajni su zbog njihovog akumuliranja u biološkim sustavima, visoke toksičnosti, nemogućnosti detoksikacije prirodnim procesima te ulaska u biogeokemijske cikluse u okolišu (Sofilić, 2015). U vodotocima i podzemnoj vodi završava velika količina otpadnih voda iz industrije i poljoprivrede kojima se u okoliš unose metali, što u konačnici ima štetan utjecaj na sve žive organizme.

Lokalna onečišćenja vode teškim metalima iz nepokretnih (točkastih) izvora, kao što su industrijska i termoenergetska postrojenja te ljevaonice teških metala mogu imati značajan utjecaj na vode, a i na zdravlje lokalnog stanovništva, što je česta pojava u zemljama u kojima ne postoji adekvatna kontrola industrijskih ispusta i kvalitete vode (Sofilić, 2015).

### 1.5 Metali u vodenim organizmima

Glavna biološka podjela metala je na esencijalne i toksične, a temelji se na njihovoj ulozi u organizmu. Metale koji predstavljaju važnu komponentu u metaboličkim procesima živih organizama nazivamo esencijalnim ili biološki neophodnim metalima. Krv kralješnjaka sadržava željezo (Fe) koje omogućuje disanje i prijenos kisika do stanica, kalij, kalcij i natrij (K, Ca i Na) svojom izmjenom u stanici omogućavaju podražaje živčanog sustava, a za formiranje skeleta neophodan element je Ca. Esencijalni metali čine i strukturne jedinice hormona i enzima te reguliraju funkcije gena, a tu ubrajamo makroelemente Ca, K, magnezij (Mg) i Na te mikroelemente Cu, Zn, kobalt (Co), Cr, mangan (Mn), molibden (Mo), nikal (Ni), selen (Se), Fe (Wood i sur., 2012a). Iako su neophodni organizmu, esencijalni metali mogu postati toksični u slučaju povećanja njihove koncentracije iznad optimalne u tijelu nekog živog organizma (Anke, 2004).

Metali za koje do sada nije otkrivena uloga u metaboličkim procesima nazivamo toksičnim ili neesencijalnim. Toksični metali se zbog svoje kemijske sličnosti s esencijalnim metalima unose u organizam istim putevima unosa, gdje mogu zamijeniti esencijalne metale vezanjem na funkcionalne skupine ili ionskom zamjenom u biološki važnim molekulama čime se mijenja aktivna konformacija molekula i dolazi do metaboličkih poremećaja, što posljedično dovodi do toksičnih učinaka, a ovisno o koncentraciji metala i do smrti organizma. U skupinu toksičnih metala ubrajaju se aluminij (Al), As, kadmij (Cd), olovo (Pb), srebro (Ag), stroncij (Sr), uran (U), živa (Hg) (Wood i sur., 2012b).

Vodeni organizmi unose metale u tijelo preko cijele površine kože, putem respiratornih organa te prehranom apsorbiranjem preko probavnog epitela, a najčešći je unos kombinacijom navedenih putova. U vodi su organizmima metali dostupni isključivo u hidratiziranom obliku, odnosno u vodi su ioni metala okruženi sa šest molekula vode. Promjene u kemijskom obliku metala utječu na njegovu biodostupnost. Tako je npr. Cu u ionskom obliku mnogo toksičniji za vodene organizme nego organski vezan, dok je Hg toksičniji u organskom obliku. Metali se osim u hidratiziranom obliku u vodi javljaju i u partikularnom obliku adsorbirani na površinu jednostaničnih organizama, koloida ili unutar mikroorganizama (Raspor, 2004).

Opasnost za vodene organizme uglavnom predstavljaju metali koji u organizmu imaju različite uloge, a soli su im dobro topive u vodi. Međutim, utjecaj metala na organizam ovisi o brojnim abiotičkim (temperatura, salinitet, pH, intenzitet svjetlosti, količina otopljenih plinova) i biotičkim (fiziologija i kondicijsko stanje organizma) čimbenicima. Osjetljivost na metale veća je u juvenilnim stadijima, a osim o starosti, ovisi i o veličini, spolu, staništu i prehrani organizma (Livingstone, 1993).

## 1.6 Biomonitoring i biomarkeri

Monitoring je pojam koji obuhvaća motrenje utjecaja okolišnih čimbenika u nekom prostoru i vremenu, a ima za cilj prikupljanje podataka o prisutnosti i distribuciji onečišćujućih tvari, njihovih izvora i određivanje njihovih koncentracija na mjernim točkama i predstavlja sastavni dio sustava zaštite prirode. S obzirom na primijenjene metode praćenja stanja ekosustava, monitoring može biti kemijski (CM, eng. *Chemical Monitoring*), bioakumulacijski (BAM, eng. *Bioaccumulation Monitoring*), monitoring bioloških učinaka (BEM, eng. *Biological Effects Monitoring*), zdravstveni (HM, eng. *Health Monitoring*), monitoring ekosustava (EM, eng. *Environmental Monitoring*) te biološki monitoring ili biomonitoring (BM, eng. *Biological Monitorig*) (van der Oost i sur., 2003).

Biomonitoring je skup analiza kojima se detektiraju i kvantificiraju biokemijske interakcije između zagađivača i biološkog odgovora živog organizma, a koncentracije zagađivača koje su potrebne da bi potaknule ovaj odgovor trebaju biti niže od onih koje dovode organizam u životnu opasnost ili izazivaju degradaciju ekosustava (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Najveći nedostatak u analizi prirodnih voda je manjak korelacije između koncentracije zagađivala i njihove biološke dostupnosti (Phillips i Rainbow, 1993). Stoga se za praćenje utjecaja onečišćenja u vodenom okolišu koriste akvatički organizmi koji u sebi akumuliraju zagađivala, a nazivaju se bioindikatorski organizmi. Uz navedeno, ovi organizmi moraju biti brojni, lako dostupni za uzorkovanje tijekom cijele godine, široko rasprostranjeni, predstavljati bitnu kariku u hranidbenom lancu, imati dovoljno dug životni vijek, biti prikladne veličine za istraživanja, biti dovoljno robusni da prežive transport, omogućavati jednostavnu determinaciju te imati veliku ekonomsku važnost (Raspor i sur., 2005). Prvi programi biomonitoringa započeli su oko 1970. godine u SAD-u (Goldberg i sur., 1978) koristeći dagnje kao bioindikatorske organizme (eng. *Mussel Watch*). Danas se

najčešće koriste raci, školjkaši i ribe kao prikladni bioindikatorski organizmi procjene onečišćenja vodenih ekosustava.

U svrhu što ranijeg otkrivanja utjecaja onečišćenja na organizme, u procjeni biološkog učinka se u biomonitoring studijama koriste biomarkeri. To je zajednički naziv za promjene staničnih struktura ili funkcija koje nastaju nakon izlaganja organizama toksičnim tvarima iz okoliša. Kada štetne tvari dospiju do mjesta toksičnog djelovanja izazivaju mjerljivi i specifični učinak, poput oštećenja te pobudne sinteze ili inhibicije biološki važnih molekula, stoga imaju velik toksikološki značaj (Erk i sur., 2002). Osim na staničnoj, biokemijski utjecaj zagađivala može imati posljedice i na višim organizacijskim razinama, poput promjena na razini populacije ili ekosustava. Međutim, brzina pojave promjena uzrokovanih unosom zagađivala u sustav varira s obzirom na razinu biološke organizacije. Poremećaji na razini populacije su manje specifični i daju odgovor tek nakon dugotrajne izloženosti, kada je toksičnim učinkom zahvaćena već cijela populacija. Za razliku od njih, promjene na razini stanice su brzo uočljive te se biomarkeri koriste kao rani pokazatelji onečišćenja (Filipović Marijić, 2004, 2009).

Idealan biomarker u ekotoksikološkim istraživanjima ne pokazuje sezonsku varijabilnost kao odgovor na dostupnost hrane i reproduktivni status, nego varira samo zbog onečišćenja, ali u praksi je ovo rijedak slučaj (Sheehan i Power, 1999). Biomarkeri koji se koriste moraju omogućiti razlikovanje utjecaja okolišnih čimbenika od antropogenog utjecaja (Hamer i sur., 2008). Zato je potrebno odrediti bazalne koncentracije biomarkera u istraživanom organizmu kako bi se promjene uzrokovane onečišćenjem mogle razlikovati od prirodne varijabilnosti biomarkera te kako bi se ispravno interpretirali rezultati (Ivanković i sur., 2003).

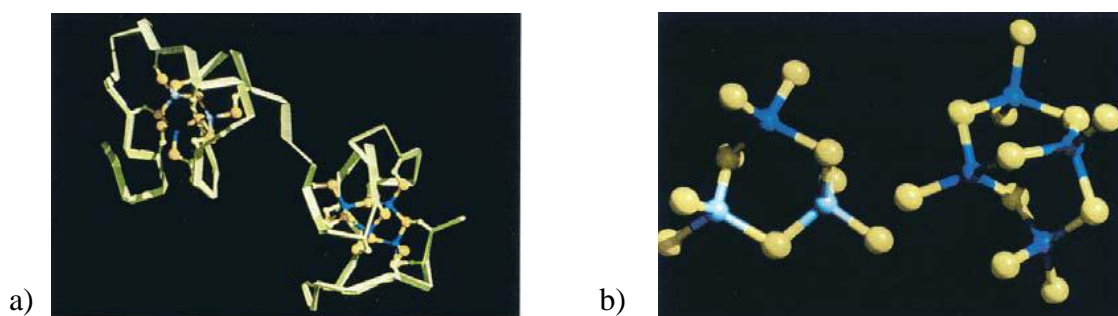
### **1.6.1 Metalotioneini**

Metalotioneini (MT) su niskomolekularni, termostabilni proteini koji su sveprisutni kod prokariota i eukariota te su identificirani u mnogim tkivima beskralješnjaka i kralješnjaka (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Struktura im je ostala konzervirana tijekom evolucije, a karakterizira je specifičan aminokiselinski sastav s oko 30 % cisteina te nedostatak aromatskih aminokiselina i histidina. Zahvaljujući tiolnim skupinama (-SH) na



cisteinskim ostacima, MT imaju visok afinitet za vezanje kationa poput Ag, Cd, Cu, Hg i Zn (Marie i sur., 2006).

Primarna funkcija MT je održavanje homeostaze esencijalnih (Zn i Cu) i detoksifikacija neesencijalnih metala (Cd, Hg i Ag) (Viarengo i Nott, 1993). Povećanjem koncentracije metala u tkivima dolazi do njihovog vezanja na MT čime se potiče pobudna sinteza MT (Amiard i sur., 2006) te se upravo ovaj biokemijski odgovor koristi kao specifični biomarker izloženosti metalima (Lecoeur i sur., 2004). Po molekuli MT postoji sedam veznih mjesta u proteinu za dvovalentne metale ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) koji su tetraedarski koordinirani unutar dvije izolirane metalotioneinske domene: karboksi-terminalna  $\alpha$ -domena sa stehiometrijom M4S11 (*cluster* s 4 atoma metala) te amino-terminalna  $\beta$ -domena sa stehiometrijom M3S9 (*cluster* s 3 atoma metala) (Slika 1). Ukoliko su ioni metala jednovalentni, poput  $Cu^+$  i  $Ag^+$ , struktura može biti digonalna ili trigonalna, a čine je i dalje 2 *cluster*a, no uz razliku što svaki sadrži 6 iona (Vašak i sur., 1980).



**Slika 1** Kristalna struktura  $Cd_5,Zn_2$ -metalotioneina iz jetre štakora: a)  $\beta$  *cluster* sa strukturom  $Zn_2,CdS(Cys)_9$ ; b)  $\alpha$  *cluster* sa strukturom  $Cd_4S(Cys)_{11}$  (tamno plavo je Cd, svjetlo plavo je Zn, žuto je S) (iz Robbins i Stout, 1992).

Pobudni odgovor MT u riba ovisi o vrsti, starosti, spolu, fiziološkom stanju organizma, pH vrijednosti, temperaturi, salinitetu, sezoni, a ne samo o koncentraciji biološki dostupnih metala u vodi. Također, hormoni, reproduktivni stadij i nutritivni status utječu na vezanje metala na MT ili potiču njegovu indukciju. Stoga je u terenskim istraživanjima vrlo bitno razlučiti biotičke i abiotičke uzroke indukcije MT od antropogenih utjecaja (Filipović Marijić i Raspor, 2012, 2014).

### 1.6.2 Ukupni citosolski proteini

Tekućina koja se nalazi unutar stanica naziva se citosol i sastoji se od oko 80% vode i niza otopljenih i neotopljenih tvari. Citosol također sadrži i velike količine makromolekula, poput nukleinskih kiselina, ugljikohidrata, proteina i lipida te se u njemu odvijaju brojni metabolički procesi, prijenos signala i transport metabolita (Šverko, 1997).

Proteini su esencijalne makromolekule koje služe kao konstruktivne sastavnice stanica i tkiva, prenose i pohranjuju male molekule, prenose informacije između stanica te osiguravaju obranu od infekcija. Ključna uloga proteina je da djeluju kao enzimi koji kataliziraju gotovo sve kemijske reakcije u biološkim sustavima. Na taj način proteini upravljaju gotovo svim aktivnostima stanice, što omogućava njihova specifična struktura. Oni su polimeri sastavljeni od dvadeset različitih aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama i poprimaju svojstvenu trodimenzionalnu konformaciju koja je bitna za njihovu funkciju (Cooper i Hausman, 2004). Smanjena ili pojačana sinteza proteina reflektira stanje ravnoteže u organizmu te ukazuje na poremećenu sintezu i ulogu proteina u organizmu pod utjecajem vanjskih stresora.

Izlaganje povišenim koncentracijama zagađivala, uključujući i metale dovodi do poremećaja ravnotežnog stanja te rezultira promjenama sinteze proteina koje je moguće uočiti određivanjem ukupnog sadržaja citosolskih proteina u stanici. Kao i u ostalih biomarkera, na proteine utječu i abiotički i biotički čimbenici te im koncentracija ovisi o vrsti organizma, tkivu, reproduktivnom ciklusu. Zbog toga je važno u prirodnim uvjetima razlučiti abiotičke i fiziološke utjecaje od antropogenih na koncentracije ukupnih citosolskih proteina (Filipović Marijić i Raspor, 2010).

## 1.7 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja u ovom diplomskom radu bio je procijeniti antropogeni utjecaj na dio vodotoka rijeke Krke koji je pod neposrednim utjecajem komunalnih i industrijskih otpadnih voda, koje ne prolaze adekvatan postupak pročišćavanja. S obzirom da je ovo područje smješteno samo 500 m od centra grada Knina i 2 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka, praćenjem niza fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode, koncentracija 25 ukupno otopljenih metala u vodi te bioloških i ekotoksikoloških pokazatelja u potočnoj pastrvi (*Salmo trutta*, Linnaeus, 1758) procijenit će se potencijalna opasnost i za Nacionalni park Krka.

U okviru ovog istraživanja postavljene su sljedeći ciljevi:

- procijeniti kakvoću vode rijeke Krke u dijelu vodotoka uz točkaste izvore zagađenja grada Knina praćenjem fizikalno-kemijskih čimbenika;
- usporediti koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi na izvoru rijeke Krke te na šest postaja u dijelu vodotoka uz grad Knin i nizvodno prema početku Nacionalnog parka Krka;
- odrediti potencijalni antropogeni utjecaj na organizme koji žive u vodi, mjerenjem koncentracija metala u citosolskoj frakciji jetre pastrva, kao dijelu stanice u kome su biološki raspoloživi oblici metala te ukazuju na potencijalnu opasnost za organizme;
- odrediti biološke promjene na staničnoj razini (promjene razina ukupnih citosolskih proteina i metalotioneina) u jetri potočne pastrve;
- pravovremeno upozoriti na promjenu kakvoće vode ovog dijela vodotoka rijeke Krke te procijeniti postoji li potencijalna opasnost za Nacionalni park Krka;
- odrediti postoje li i razlike između dviju sezona (proljeće i jesen) s obzirom na varijabilnost klimatoloških utjecaja te fiziologiju riba.

## 2 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

### 2.1 Rijeka Krka

Rijeka Krka sa sedam sedrenih slapova predstavlja prirodni fenomen Dinarskog krša. Izvire u podnožju planine Dinare, 3,5 km sjeveroistočno od Knina, u špilji podno 22 m visokog Topoljskog slapa, koji se još naziva Veliki buk ili Krčić (Bonacci i Perica, 1990) (Slika 2). U porječju Krke mogu se izdvojiti tri dijela: planinsko područje na sjeveroistočnom dijelu, polja (dolinska proširenja) u središnjem dijelu i Sjevernodalmatinska zaravan (Perica i sur., 2007). Krka je sa zapada, sjevera i istoka okružena planinskim masivima Velebita, Dinare, Svilaje i Mosora, a od polja u njezinom slijevu dominiraju Plavno, Kninsko, Kosovo i Petrovo polje. U slatkovodnom dijelu toka prima pet pritoka: Krčić, Kosovčicu, Orašnicu, Butižnicu i Čikolu s Vrbom, a u potopljenom dijelu ušća rijeku Guduču. S potopljenim dijelom ušća Krka je duga oko 72,5 km, od čega slatkovodni dio toka čini 49 km, a bočati 23,5 km. Ukupni pad iznosi 242 m, a rijeka utječe u Jadransko more kraj Šibenika. Krka se cijelom svojom duljinom nalazi u Šibensko-kninskoj županiji. Područje od 109 km<sup>2</sup> porječja Krke (dva kilometra nizvodno od Knina do Skradina) i donjeg toka rijeke Čikole proglašeno je 1985. godine Nacionalnim parkom Krka (URL 1).

Uzdruž kanjona rijeke Krke nalaze se izvori Miljacka i Jaruga, a u kanjonu rijeke Čikole izvor Torak. Još 1985. godine dokazano je kako su Krka i Zrmanja izravno povezane preko izvora Miljacka, što predstavlja jedinstven hidrogeološki fenomen. Zbog kompleksnih hidrografskih odnosa i podzemne povezanosti krških rijeka, teško je odrediti vododijelnice između slivova Krke, Zrmanje, Une i Cetine (Bonacci i Ljubenković, 2005).



a)



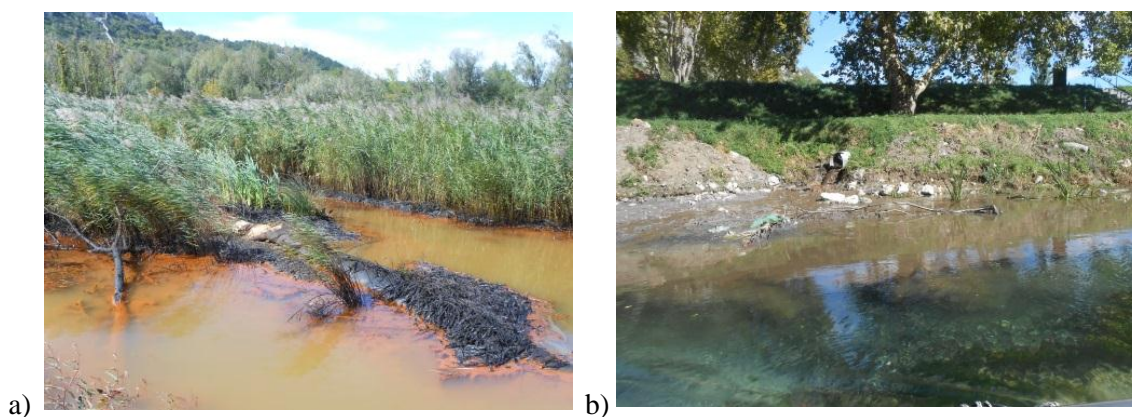
b)

**Slika 2** Fotografije dijela vodotoka rijeke Krke: a) Topoljski buk i izvor rijeke Krke; b) dio toka uz grad Knin (snimile Vlatka Filipović Marijić i Marijana Erk).

Dolina Krke poligenetskog je postanka, odnosno područje sliva rijeke Krke izgrađuju naslage perma, trijasa, jure, krede, tercijara i kvartara. Područje nizvodno od Knina najvećim dijelom izgrađuju vodopropusne (vapnenci) i djelomično vodonepropusne (dolomiti, laporoviti i pločasti vapnenci i vapnenački lapori) stijene (Perica i sur., 2007). Izvor rijeke Krke je tipični reokreni izvor, kod kojeg voda, koja izlazi iz podzemlja na površinu, odmah formira snažan tok, koji je stvorio mnoge duboke kanjone. Zahvaljujući dinamičnom procesu međusobnog djelovanja fizikalnih i kemijskih čimbenika te živih organizama u vodi nastala je sedra ili travertin. To su vapnenačke stijene koje najvećim dijelom nastaju inkrustacijom zajednice mahovina (Bryophyta), a odlikuju se lakim i brzim trošenjem zbog svoje male tvrdoće (Polšak i sur., 1990). Upravo sedam sedrenih slapišta rijeke Krke (Bilušića buk, Brljan (Čorića buk), Manojlovački slap, Rošnjak, Miljacka slap, Roški slap i Skradinski buk) predstavlja krški fenomen. Iznimna ljepota krajobraza rijeke Krke, prirodna i kulturna baština jedne su od temeljnih vrijednosti zbog kojih je ovo područje proglašeno nacionalnim parkom. Područje NP Krka nalazi se na prijelazu iz vazdazelene mediteranske vegetacije u listopadnu submediteransku vegetaciju. Ovakav položaj te veliki broj različitih staništa uvjetovali su veliku raznolikost biljnog i životinjskog svijeta s brojnim endemičnim i ugroženim vrstama.

Rijeka Krka je zbog svog prometnog i turističkog značaja, odnosno zemljopisnog položaja izložena različitim ljudskim aktivnostima koje predstavljaju potencijalnu opasnost za očuvanje njezinih izvornih ljepota. Iako slivno područje rijeke Krke nije gusto naseljeno, antropogeni utjecaj se može uočiti u blizini grada Knina. Naime, tvornica vijaka

DIV d.o.o., koja se nalazi na ušću rijeke Orašnice u Krku, indirektno utječe na kakvoću vode rijeke Krke jer svoje tehnološke otpadne vode ispušta na područje veličine preko 3,5 km<sup>2</sup>. Ovo područje bi trebalo služiti za pročišćavanje, no kako ne postoji odgovarajući sustav koji bi pročistio otpadne vode, prozvano je "kninska crna jama" na temelju neuglednog izgleda (Slika 3a). Zbog prevlasti karbonatnih stijena i njihove tektonske razlomljenosti može lako doći do poniranja ovih otpadnih voda u podzemlje čime se ugrožavaju izvori pitke vode (Perica i sur., 2007). Nadalje, tijekom razdoblja visokog vodostaja, otpadne vode se prelijevaju u pritoku rijeke Krke, Orašnicu, a zatim dalje u rijeku Krku. Također, u Krku se direktno ispuštaju komunalne otpadne vode grada Knina bez prethodnog adekvatnog pročišćavanja (Slika 3b).



**Slika 3** Fotografije točkastih izvora zagađenja na dijelu vodotoka rijeke Krke uz grad Knin:  
a) tehnološke otpadne vode tvornice vijaka DIV d.o.o., tzv. "kninska crna jama";  
b) komunalne otpadne vode grada Knina (snimile Vlatka Filipović Marijić i Marijana Erk).

S obzirom da do sada nije provedena sveobuhvatna procjena antropogenog utjecaja na dio vodotoka rijeke Krke koji je pod neposrednim utjecajem tehnoloških i komunalnih otpadnih voda, prepoznata je iznimna važnost ovog istraživanja, ne samo za lokalnu zajednicu nego i za cijelu Republiku Hrvatsku zbog zaštite Nacionalnog parka Krka. Prikazana istraživanja provedena su u okviru projekta „Procjena kakvoće vodotoka rijeke Krke i potencijalne opasnosti za Nacionalni park Krka primjenom novih bioindikatora i biomarkera“, voditeljice dr. sc. Vlatke Filipović Marijić, koji je financirala Zaklada Adris tijekom 2015./2016. godine u sklopu Natječaja za dodjelu sredstava Zaklade Adris 2014. godine.

## 2.2 Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno tijekom 2015. godine u proljetnom (21.-22.4.) i jesenskom periodu (30.9.-1.10.) na sedam postaja na rijeci Krki: KR-IZ 1 - izvor rijeke Krke, područje bez utjecaja onečišćenja koje služi kao referentna postaja; lokacije u blizini Knina koje su pod antropogenim utjecajem: TOV-D 2 - uzorci uzeti direktno iz bazena s tehnološkim otpadnim vodama iz tvornice vijaka DIV d.o.o. (tzv. „kninska crna jama“); OR 3 - Orašnica, pritoka rijeke Krke koja prolazi pored tvornice vijaka i područja s tehnološkim otpadnim vodama; KOV-D 4 - uzorci prikupljeni direktno iz ispusne cijevi komunalnih otpadnih voda; KR-KOV 5 - dio toka rijeke Krke uz ispus komunalnih otpadnih voda grada Knina; KR-NIZ 6 - rijeka Krka 1 km nizvodno od utjecaja onečišćenja i 1 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka; BU 7 - rijeka Butižnica, pritoka rijeke Krke koja je pod utjecajem poljoprivrednih djelatnosti i utječe u Krku oko 1,5 km uzvodno od granice Nacionalnog parka Krka (Slika 4).



**Slika 4** Lokacije uzorkovanja na rijeci Krki: KR-IZ 1 - izvor rijeke Krke koji predstavlja kontrolnu postaju bez utjecaja onečišćenja te šest postaja uz grad Knin koje su pod antropogenim utjecajem: TOV-D 2, OR 3, KOV-D 4, KR-KOV 5, KR-NIZ 6 i BU 7.

U svrhu procjene kakvoće rijeke Krke uz grad Knin, uzorci vode su prikupljeni na referentnoj postaji (području bez utjecaja onečišćenja), izvoru rijeke Krke te na mjestima utjecaja točkastih izvora onečišćenja na rijeku Krku (ostale postaje uz grad Knin), čije su karakteristike opisane u Tablici 1. U uzorcima vode određeni su fizikalno-kemijski

čimbenici, kao i koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi tijekom dvije sezone. U proljetnoj sezoni su dodatno provedene navedene analize i u uzorku komunalnih otpadnih voda, a u jesen u uzorku iz „kninske crne jame“ te rijeci Butižnici kako bi dobili što realniji uvid u kakvoću vode. Kao indikatorska vrsta za procjenu mogućeg utjecaja onečišćenja na biotu izabrana je potočna pastrva (*Salmo trutta*), tipičan predstavnik ihtiofaune rijeke Krke, koja je zbog svoje mobilnosti u obje sezone uzorkovana na dvije postaje, izvoru rijeke Krke te uz grad Knin.



**Tablica 1** Karakterizacija područja uzorkovanja duž rijeke Krke sa prikazanim oznakama mjesta, izvorom onečišćenja i datumima uzorkovanja

Područje uzorkovanja	Oznaka mjesta	Izvor potencijalnog onečišćenja	Sezone uzorkovanja
Izvor rijeke Krke- referentna postaja	KR-IZ (1)	nepoznati izvori onečišćenja	proljeće (22.4.2015) jesen (1.10.2015)
Bazeni sa tehnološkim otpadnim vodama iz tvornice vijaka	TOV-D (2)	tehnološke otpadne vode iz pogona tvornice vijaka	jesen (1.10.2015)
Rijeka Orašnica - pritoka rijeke Krke koja teče u blizini bazena s tehnološkim otpadnim vodama iz tvornice vijaka	OR (3)	tehnološke otpadne vode iz pogona tvornice vijaka; poljoprivredni ispust	proljeće (22.4.2015) jesen (1.10.2015)
Ispuna cijev komunalnih otpadnih voda	KOV-D (4)	ispust komunalnih otpadnih voda	proljeće (22.4.2015)
Rijeka Krka u blizini ispusta komunalnih otpadnih voda	KR-KOV (5)	ispust komunalnih otpadnih voda; poljoprivredni ispust	proljeće (22.4.2015) jesen (1.10.2015)
Rijeka Krka 1 km nizvodno od utjecaja onečišćenja	KR-NIZ (6)	poljoprivredni ispust; izvori onečišćenja u blizini grada Knina	proljeće (22.4.2015) jesen (1.10.2015)
Rijeka Butižnica, pritoka rijeke Krke nizvodno od utjecaja onečišćenja	BU (7)	poljoprivredni ispust	jesen (1.10.2015)

### 3 MATERIJALI I METODE

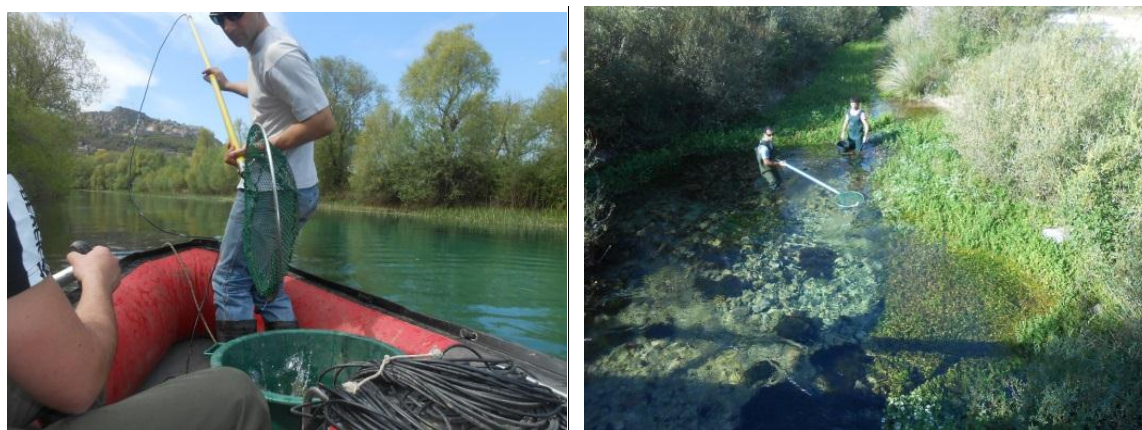
#### 3.1 Indikatorski organizam - potočna pastrva

Potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) slatkovodna je riba koja pripada porodici pastrva (Salmonidae) te razredu zrakoperki (Actinopterygii) (Slika 5). Rasprostranjena je u većini europskih vodotoka, a u Hrvatskoj živi u rijekama dunavskog i jadranskog slijeva. Jedna je od najpoznatijih riba u športskom ribolovu. Njezin taksonomski status je problematičan jer su opisane brojne geografske forme i podvrste, poput jezerske i potočne forme. Prema Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske, potočna pastrva ima IUCN status osjetljive vrste (VU) (Mrakovčić i sur., 2006). Ugrožena je najviše zbog regulacije i pregrađivanja vodotoka, čime se onemogućava njezina migracija prema izvorišnim dijelovima. Do smanjenja brojnosti populacija dolazi i zbog poribljavanja te globalnog zatopljenja. Tijelo joj je lateralno spljošteno i vretenasto pa je tako prilagođena za život u brzim vodotocima bogatim kisikom. Po leđima ima karakteristične crne mrlje s bijelim rubovima, a na bokovima crvene, obrubljene svijetloplavim ili bijelim rubovima (Mrakovčić i sur., 2006). Obojenje tijela je varijabilno, a ovisi o staništu, starosti i veličini same ribe. Tijelo odrasle jedinke može doseći dužinu od 15 do maksimalno 70 cm te masu od 100 g do 6 kg, ovisno o starosti jedinke i resursima u okolišu. Mužjaci i ženke spolno su zreli s 2 do 3 godine. Mrijest započinje kasno ujesen i traje većinom od studenoga do veljače te u tom razdoblju pastrva migrira uzvodno. S obzirom da ne migriraju sve jedinke, razlikuju se anadromne, jezerske i rezidentne forme (Kottelat i Freyhof, 2007). Živi u gornjim i srednjim dijelovima rijeke, tj. u zoni pastrve, lipljena i mreke. Zahvaljujući dobro razvijenim cikloidnim ljuskama koje se nalaze na površini tijela potočne pastrve, moguće je odrediti starost pojedine ribe (Maitland i Linsell, 2009).



**Slika 5** Potočna pastrva (*Salmo trutta*) iz rijeke Krke (snimila Vlatka Filipović Marijić).

Za razliku od uzoraka vode, ribe zbog svoje mobilnosti nisu uzorkovane na većem broju postaja, nego malo nizvodnije od izvora rijeke Krke i na dijelu toka uz točkaste izvore zagađenja kod grada Knina. Uprava ribarstva Ministarstva poljoprivrede (525-13/0545-15-2) odobrila je ulov riba, koji je proveden primjenom elektro-agregata prema normi HRN EN 14011 (2005) (Slika 6), nakon čega su jedinke u visokim plastičnim posudama s aeriranom riječnom vodom dopremljene do laboratorija u Kninu. Zatim su ribe usmrćene primjenom anestetika MS-222 (Sigma, SAD). Usmrćivanje i izolaciju tkiva riba su proveli članovi Laboratorija za biološke učinke metala, koji je registriran pri Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede za usmrćivanje riba te rad na izoliranim organima, tkivima i trupovima životinja koje su usmrćene u tu svrhu (HR-POK-025).



**Slika 6** Ulov riba elektro-agregatom za omamljivanje riba EL63II-GI snage 5,0 kW (Hans Grassl GmbH, Njemačka) (snimila Vlatka Filipović Marijić).

### **3.2 Određivanje biometrijskih parametara riba**

Jedinkama riba su određeni osnovni biometrijski pokazatelji:

- ukupna dužina – od početka glave do kraja repne peraje (cm)
- ukupna masa (g)
- masa jetre i gonada (g)
- Fultonov kondicijski indeks ( $\text{g cm}^{-3}$ ) x 100:  $(\text{ukupna masa (g)}/\text{ukupna dužina (cm}^3)) \times 100$
- Hepatosomatski indeks (%):  $(\text{masa jetre (g)}/\text{ukupna masa (g)}) \times 100$
- Gonadosomatski indeks (%):  $(\text{masa gonada (g)}/\text{ukupna masa (g)}) \times 100$
- spol – određen je vizualno, a po potrebi pregledom nativnih preparata gonada svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 100x

Tkivo jetre je izolirano u terenskom laboratoriju i pohranjeno u tekućem dušiku na  $-195,8$  °C te je tako prevezeno do Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Tu je pohranjeno u zamrzivač na  $-80$  °C do daljnje obrade tkiva.

### 3.3 Mjerenje fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode

Tijekom ovog istraživanja neposredno na terenu (*in situ*) su sondom SevenGo (Mettler Toledo) na odabranim postajama određeni sljedeći fizikalno-kemijski čimbenici: temperatura, vodljivost, ukupno otopljene soli (TDS), količina otopljenog kisika (DO, eng. Dissolved Oxygen), zasićenje kisikom, oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP) te pH (Slika 7). Istovremeno s mjerenjima na terenu, na svakoj postaji uzeti su uzorci vode od 0,5 L u triplikatu za ostale analize, pohranjeni na tamno mjesto te čuvani na temperaturi od 5 °C do obrade u laboratoriju. Tijekom kemijske analize u laboratoriju izmjerene su još: koncentracije iona hranjivih soli (nitrita ( $\text{N-NO}_2^-$ ), nitrata ( $\text{N-NO}_3^-$ ), orto-fosfata ( $\text{P-PO}_4^{3-}$ ), amonij ( $\text{NH}_4^+$ ), ukupni dušik (TN) i fosfor (TP)), količina otopljenog slobodnog ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2$ ), kemijska potrošnja kisika (KPK), *m*-alkalitet te karbonatna i ukupna tvrdoća vode. Metode kojima su uzorci analizirani opisane su u knjizi Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (2012).



**Slika 7** Mjerenje fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode pomoću sonde SevenGo (Mettler Toledo) (snimila Vlatka Filipović Marijić).

Kao indirektni pokazatelj koncentracije otopljene organske tvari (DOM, eng. Dissolved Organic Matter) primijenila se kemijska potrošnja kisika (KPK) prema standardnoj metodi HRN EN ISO 8467:2001. Količina otopljenog slobodnog CO<sub>2</sub> je određena standardnom titracijskom metodom s otopinom Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> uz dodatak fenolftaleina. Ukupni dušik je određen oksidativnom digestijom s peroksodisulfatom (EN ISO 11905-1:1997), ukupni fosfor s amonijevim molibdatom, a količina amonijaka kolorimetrijski. Pomoću koncentrirane dušične i sumporne kiseline, svi fosfati su pretvoreni u ortofosfate. Ortofosfati su određeni UV/VIS spektrofotometrom (HACH DR 6000, SAD), metodom s askorbinskom kiselinom, količina nitrita određena je metodom diazotiranja te količina nitrata metodom redukcije kadmijem. Titracijom uzorka vode s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> uz metiloranž kao indikator određen je alkalitet te se naziva *m*-alkalitet (metiloranž-alkalitet), a izražen je kao mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Karbonatna tvrdoća vode određena je titrimetrijski s HCl, a ukupna tvrdoća vode (koncentracija pozitivnih kalcijevih (Ca<sup>2+</sup>) i magnezijevih (Mg<sup>2+</sup>) iona u vodi) analizirana je titrimetrijski s otopinom EDTA. Klasifikacija površinskih voda određena je prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013).

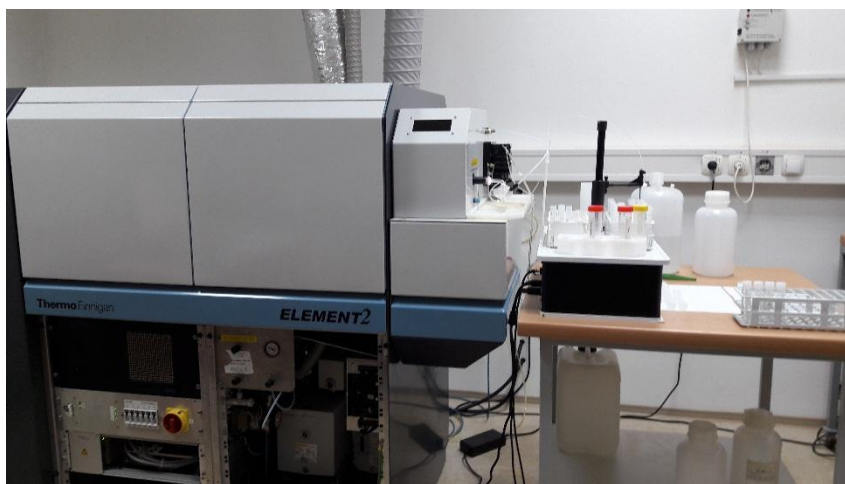
### **3.4 Određivanje koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi**

Uzorkovanje vode za analizu ukupno otopljenih metala u vodi provedeno je usporedno s uzorkovanjem vode za analizu fizikalno-kemijskih čimbenika. Na navedenim postajama uzeti su uzorci riječne vode u triplikatu i pohranjeni u plastične polietilenske boce (25 mL), prethodno isprane dušičnom kiselinom (v/v 10 %, p. a., Kemika, Hrvatska) te Mili-Q vodom. Prilikom rukovanja korištene su gumene rukavice bez pudera, a napunjene boce su zaštićene plastičnim vrećicama kako bi se izbjeglo dodatno onečišćenje. Odmah nakon prikupljanja, uzorci su profiltrirani na terenu kroz celulozni nitratni filter s porama veličine 0,45 μm (Sartorius, Njemačka), zakiseljeni s 400 μL koncentrirane dušične kiseline (v/v 1 %; Suprapur, Merck, Njemačka), a zatim pohranjeni na 4 °C do daljnje laboratorijske obrade.

Mjerenje ukupne koncentracije 21 mikro- i 4 makro-elementa u vodi provedeno je metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) (Slika 8). HR ICP-MS je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrofotometrijom. Koncentracija mikroelemenata izmjerena je direktno iz

uzetih uzoraka, dok je koncentracija makroelemenata u riječnoj vodi mjerena nakon što se uzorak razrijedio deset puta. Mjerenje litija ( $^7\text{Li}$ ), rubidija ( $^{85}\text{Rb}$ ), molibdena ( $^{95}\text{Mo}$ ), srebra ( $^{109}\text{Ag}$ ), kadmija ( $^{111}\text{Cd}$ ), antimona ( $^{121}\text{Sb}$ ), talija ( $^{205}\text{Tl}$ ) i olova ( $^{208}\text{Pb}$ ) provedeno je korištenjem niske rezolucije ( $m/\Delta m$  oko 300); natrija ( $^{23}\text{Na}$ ), magnezija ( $^{24}\text{Mg}$ ), aluminijsa ( $^{27}\text{Al}$ ), kalcija ( $^{42}\text{Ca}$ ), titana ( $^{47}\text{Ti}$ ), vanadijsa ( $^{51}\text{V}$ ), mangana ( $^{55}\text{Mn}$ ), željeza ( $^{56}\text{Fe}$ ), kobalta ( $^{59}\text{Co}$ ), nikla ( $^{60}\text{Ni}$ ), bakra ( $^{63}\text{Cu}$ ), cinka ( $^{66}\text{Zn}$ ), selenijsa ( $^{79}\text{Se}$ ), stroncjsa ( $^{86}\text{Sr}$ ) i barijsa ( $^{138}\text{Ba}$ ) srednje ( $m/\Delta m$  oko 4000), a kalija ( $^{39}\text{K}$ ) i arsena ( $^{75}\text{As}$ ) visoke rezolucije ( $m/\Delta m$  oko 10000).

Eksterna kalibracija je provedena pripremom odgovarajućih standardnih otopina u 5 %  $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Njemačka) iz multielementnih standardnih otopina za metale u tragovima ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ , Analitika, Republika Češka) i za makroelemente ( $\text{Ca } 2,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{Mg } 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{Na } 1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{K } 2,0 \text{ g L}^{-1}$ ; Fluka, Njemačka). U otopinu za metale u tragovima dodane su i standardne otopine Rb i Sb ( $1 \text{ g L}^{-1}$  Analytika, Republika Češka). U svaki uzorak, kalibracijski standard i slijepu probu, prije mjerenja metala dodan je interni standard indij ( $\text{In}, 1 \mu\text{g L}^{-1}$ , Fluka, Njemačka) i  $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Njemačka) čija je konačna koncentracija u uzorcima iznosila v/v 2 %. Slijepa proba služila je samo za detekciju eventualnih pogrešaka u analizi i ona sadrži samo interni standard In i kiselinu.



**Slika 8** Maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) (snimila Zuzana Redžović).

Točnost mjerenja je osigurana redovitim određivanjem koncentracije metala u odgovarajućim certificiranim materijalima (CFC) prirodnih voda poznate koncentracije tokom mjerenja, te su makroelementi mjereni u 10 puta razrijeđenom certificiranom uzorku (QC Minerals, Catalog number 8052, UNEP GEMS, Burlington, Canada), a mikroelementi u certificiranom referentnom uzorku riječne vode (SLRS-4 – river water from Ottawa River, Ontario, Canada, National Research Council Canada). Usporedba izmjerenih i certificiranih udjela metala u referentnim uzorcima pokazala je visoku točnost mjerenja metala na HR ICP-MS-u.

### **3.5 Obrada tkiva jetre u svrhu određivanja koncentracija citosolskih metala i staničnih biomarkera**

Početni korak obrade tkiva pastrve započinje homogenizacijom s ciljem istiskivanja stanične tekućine iz tkiva. U tu svrhu korišten je homogenizator s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Everhjem GLAS-COL, SAD) pri 6000 okretaja u minuti. Kako bi se spriječila razgradnja proteina, uzorci i sav potrebni pribor i kemikalije se tokom cijelog postupka drže na ledu. Uzorci jetre su homogenizirani u TrisHCl/Base puferu, pH = 8,5 (4 °C) (Sigma, SAD) koji je priređen kao 100 mM za mjerenje citosolskih metala, odnosno 20 mM za MT i citosolske proteine. U pufer su dodani inhibitori proteolitičke aktivnosti (0,5 mM fenil-metilsulfonil-fluorid (PMSF, Sigma, SAD), otopljen u etanolu) i 0,006 mM leupeptin (LEU, Sigma, SAD), otopljen u 20 mM Tris-HCl) te reducens 1 mM ditioneitol (DTT, Sigma SAD), koji se dodaje s ciljem sprječavanja oksidacije proteina na zraku. Za određivanje MT kao reducens je korišten β-merkaptoetanol (Sigma SAD), a u pufer je još dodana 0,5 M saharoza. Prije same homogenizacije je dio tkiva jetre odvagano i razrijeđeno rashlađenim 100 mM puferom 6 puta te je dobiveni homogenat centrifugiran u Avanti J-E centrifugi (BeckmanCoulter, SAD) 120 min. na 50000xg, 4 °C te su u ovoj vodotopivoj citosolskoj frakciji (S50) određene koncentracije citosolskih metala. Drugi dio tkiva jetre je razrijeđen 5 puta s rashlađenim 20 mM puferom te se nakon homogeniziranja i centrifugiranja 120 min. na 50000xg, 4 °C u dobivenoj citosolskoj frakciji određuju ukupni citosolski proteini i MT.

### **3.6 Određivanje koncentracija metala u staničnom citosolu jetre potočne pastrve**

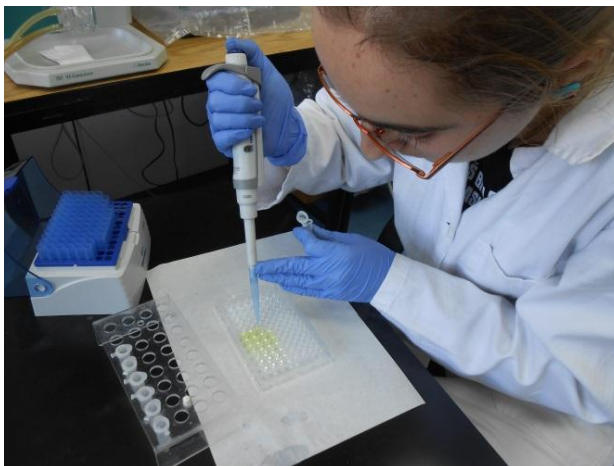
Prije mjerenja citosolskih metala, citosolska frakcija (S50) se mora prethodno razrijediti 10 puta s Mili-Q vodom kako bi bila u koncentracijskom rasponu za određivanje mikroelemenata, odnosno 100 puta za određivanje makroelemenata. Određivanje koncentracije metala u staničnom citosolu provedeno je metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka). Detaljan opis metode te mjernog postupka opisan je u poglavlju 3.5. Određivanje koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi. U citosolu jetre su uz metale izmjerene u vodi još prikazane koncentracije cezija ( $^{133}\text{Cs}$ ), olova ( $^{208}\text{Pb}$ ) i urana ( $^{238}\text{U}$ ), čije mjerenje je provedeno korištenjem niske rezolucije ( $m/\Delta m$  oko 300), a navedeni metali nisu prikazani za riječnu vodu jer su im koncentracije u vodi bile ispod granice detekcije instrumenta.

### **3.7 Određivanje staničnih biomarkera**

#### **3.7.1 Određivanje koncentracije metalotioneina**

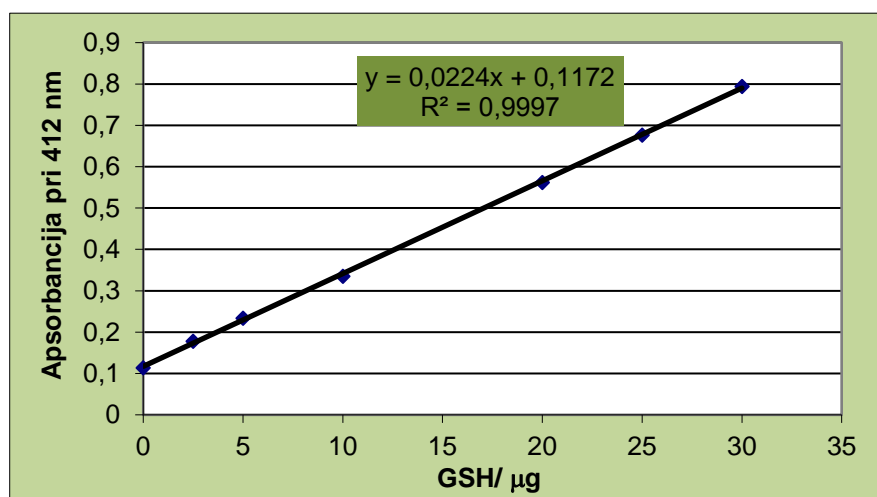
Koncentracija MT u jetri potočne pastrve određena je prema metodi opisanoj u radu Viarengo i sur. (1997; 2000) koja je prilagođena na metodu za mikroploču (250  $\mu\text{l}$  volumen uzorka umjesto 1 ml u standardnoj metodi). Metoda se zasniva na etanolnoj precipitaciji, nakon koje se spektrofotometrijski određuje sadržaj slobodnih -SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa. Prilikom etanolne precipitacije dolazi do diferencijalnog frakcioniranog taloženja proteina mješavinom organskih otapala etanola i kloroforma. Prvo se iz citosola S50 uklanjaju visokomolekularni proteini, a nakon toga se iz preostalog supernatanta taloži frakcija bogata niskomolekularnim proteinima - MT. U djelomično pročišćenom i koncentriranom uzorku MT njihova koncentracija se određuje spektrofotometrijski, na temelju reakcije tiolnih skupina cisteina s 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB, Ellmanov reagens, Sigma, SAD). Kako bi se odredio sadržaj slobodnih -SH skupina pripremljen je referentni standard - reducirani glutation (GSH, Serva, Njemačka) u koncentracijskom rasponu 2,5-30  $\mu\text{g}$  (Slika 9).





**Slika 9** Priprema koncentracijskog raspona referentnog standarda glutationa u svrhu određivanja koncentracije MT (snimila Vlatka Filipović Marijić).

Iz dobivenog kalibracijskog pravca se na temelju očitanih apsorbanci pri 412 nm na fotometru (Tecan Infinite M200, Švicarska) odredila koncentracija MT u analiziranim uzorcima (Slika 10), kao  $\text{mg g}^{-1}$  mokre mase tkiva ili  $\mu\text{g mg}^{-1}$  ukupnih citosolskih proteina nakon dijeljenja s koncentracijom proteina.



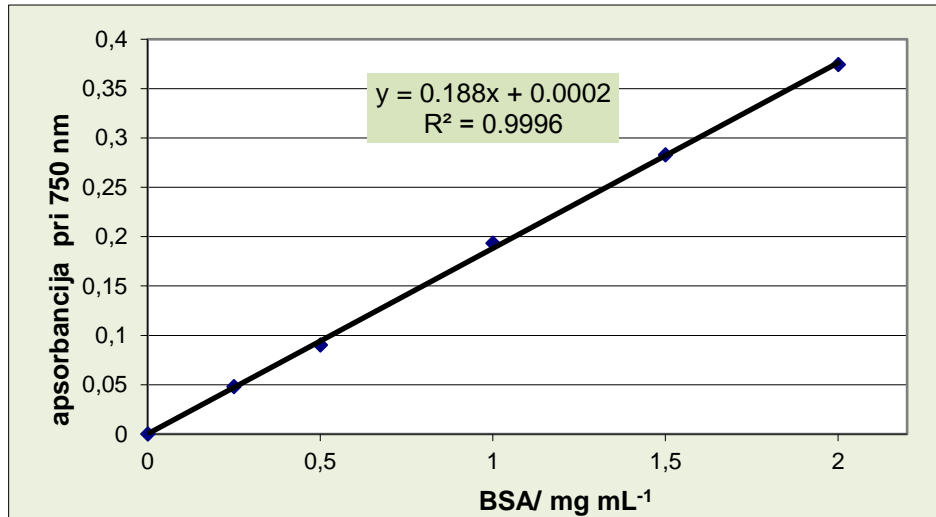
**Slika 10** Kalibracijski pravac prema kojem je određena koncentracija MT u jetri potočne pastreve. Prikazana je linearna ovisnost apsorbancije na 412 nm o koncentraciji  $-\text{SH}$  skupina referentnog standarda GSH nakon reakcije s DTNB.

### 3.7.2 Određivanje koncentracije ukupnih citosolskih proteina

Koncentracije ukupnih citosolskih proteina određene su kolorimetrijskom metodom po Lowry-u (Lowry i sur., 1951) u izoliranoj citosolskoj frakciji (S50). Metoda se temelji na reakciji  $\text{Cu}^{2+}$  iona (reagens A, bazična otopina bakrovog tartarata, Bio Rad, SAD) i Folinovog reagensa (reagens B, Bio Rad, SAD) s proteinima, što dovodi do konačnog obojenja proteina. U prvom koraku dolazi do reakcije  $\text{Cu}^{2+}$  iona (reagens A, bazična otopina bakrovog tartarata, Bio Rad, SAD) s proteinima, koji se u lužnatom mediju vežu na peptidne veze i reduciraju u  $\text{Cu}^+$ , pri čemu nastaje kompleks  $\text{Cu}^+$ -protein. U drugom koraku dolazi do redukcije Folinovog reagensa tj. nastali kompleks reagira s Folinovim reagensom (reagens B, Bio Rad, SAD) pri čemu se razvija karakteristično plavo obojenje. Obojenje primarno uzrokuju aminokiseline tirozin i triptofan, te manje cistin, cistein i histidin jer njihovi ogranci zajedno s  $\text{Cu}^+$  reagiraju s Folinovim reagensom.

Kako su koncentracije proteina u citosolskim frakcijama jetre riba više od gornje granice linearnosti kalibracijskog pravca, uzorke je bilo potrebno prije mjerenja razrijediti 25 puta te je svaki uzorak priređen u duplikatu. Zatim je na mikroploču s jažicama nanoseno po 5  $\mu\text{L}$  svakog uzorka i standarda u duplikatu. U jažice je dodano 25  $\mu\text{L}$  reagensa A i 200  $\mu\text{L}$  reagensa B te je sadržaj promiješan u mini miješalici (Ika Works, Njemačka). Mikroploča je ostavljena na tamnom mjestu 15 minuta dok se nije razvilo maksimalno plavo obojenje. Intenzitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s reagensima proporcionalan je apsorbiranom zračenju, odnosno koncentraciji proteina.

Koncentracije citosolskih proteina su određene spektrofotometrijski na 750 nm valne duljine na fotometru (Tecan Infinite M200, Švicarska), a očitane su iz kalibracijskog pravca koji je dobiven očitanjima apsorbancije otopine albumina govedeg seruma (BSA, eng. *bovine serum albumin*) priređene u rasponu 0,25-2,0  $\text{mg mL}^{-1}$ , razrjeđivanjem s puferom za homogeniziranje. Iz dobivenog kalibracijskog pravca (Slika 11) očitavaju se koncentracije ukupnih proteina i izražavaju kao  $\text{mg proteina mL}^{-1}$  citosolske frakcije. Ukoliko se ova koncentraciju pomnoži s faktorom razrjeđenja tkiva (5 puta) dobiva se koncentracija ukupnih proteina izražena kao  $\text{mg g}^{-1}$  tkiva.



**Slika 11** Kalibracijski pravac prema kojem je određena koncentracija ukupnih citosolskih proteina u jetri potočne pastrve.

### 3.8 Statistička obrada podataka

Statistička analiza je provedena u računalnom programu SPSS Statistics 20 (IBM, SAD), a grafovi su izrađeni u programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., SAD). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti (S.D.). Za usporedbu koncentracija metala između dvije sezone korišten je t-test. Usporedba podataka među postajama za uzorke vode provedena je jednosmjernom analizom varijanci (jednosmjerna ANOVA, eng. *Analysis of Variance*) ili u slučaju neravnomjerne raspodjele dobivenih podataka Kruskal-Wallis testom. Za višestruku usporedbu između parova korišteni su "*post hoc*" Tukey ili Student-Newman-Keuls test. Za ribe, koje su uzorkovane samo na dvije postaje, usporedba rezultata je provedena pomoću t-testa. Razine značajnosti istaknute su u tablicama te na grafovima.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Fizikalno-kemijski čimbenici kakvoće vode

Kako bi procijenili kakvoću vode rijeke Krke izmjerili smo fizikalno-kemijske čimbenike koji karakteriziraju toplinsko stanje vode, uvjete režima kisika, hranjive tvari, sadržaj iona, tvrdoću, zamućenost i zakiseljenost vode na 7 postaja. Temperatura vode rijeke Krke je u obje sezone bila najniža na izvoru, odnosno u proljetnom razdoblju iznosila je 9,8 °C, a u jesenskom 10,3 °C. Najviša temperatura izmjerena je u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda (KOV-D 4), kada je zabilježen porast na 14 °C (Tablica 2).

Čimbenici režima kisika ukazuju na pogoršanje kakvoće vode na dijelu vodotoka rijeke Krke uz grad Knin. Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) vrijednosti kemijske potrošnje kisika (KPK) su na svim postajama nizvodno od izvora rijeke Krke ispod dobrog ekološkog stanja vode i kreću se u rasponu od 7,4 do 47 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, s izuzetkom postaje 1 km nizvodno od Knina (KR-NIZ 6) na kojoj je u jesen zabilježeno vrlo dobro ekološko stanje (Tablica 2). Koncentracija otopljenog kisika i zasićenje kisikom prilikom otpuštanja tehnoloških (TOV-D 2) i komunalnih otpadnih (KOV-D 4) voda nalaze se ispod dobrog ekološkog stanja vode, pri čemu je zasićenje kisikom na postaji KOV-D 4 palo na samo 1,3 %. Koncentracija otopljenog kisika (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) je na postaji TOV-D 2 pala na 4,68, a na postaji KOV-D 4 na 0,13, u odnosu na izvor gdje je u rasponu od 10,4 do 10,54 u obje sezone (Tablica 2).

Koncentracije hranjivih soli (nitrata, nitrita, ortofosfata, ukupne količine otopljenog fosfora, amonijaka i dušika) su također ispod graničnih vrijednosti dobrog ekološkog stanja u obje sezone na postajama uz grad Knin i nizvodno od njega (od TOV-D 2 do BU 7), za razliku od izvora gdje je voda s obzirom na nutrijente vrlo dobrog stanja. Izuzetak su koncentracije nitrata, nitrita i ukupnog dušika nizvodno od Knina (KR-NIZ 6) te nitrita u rijeci Butižnici (BU 7) čije su vrijednosti prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) vrlo dobrog stanja (Tablica 2).

I zamućenost vode je očekivano viša na postajama uz grad Knin (od TOV-D 2 do KR-KOV 5) i kreće se u rasponu vrijednosti od 2-11 FAU (eng. *Formazin Attenuation Units*), a maksimalna vrijednost od 11 FAU izmjerena je u direktno uzetim uzorcima

otpadnih voda (TOV-D 2 i KOV-D 4). Jedino je u jesen na postaji nizvodno od Knina (KR-NIZ 6) te rijeci Butižnici (BU 7) zamućenost vode ispod 2 FAU, dok je na izvoru (KR-IZ 1) u obje sezone iznosila 0 FAU.

Povišene vrijednosti količine otopljenih soli (TDS) su izmjerene na istim postajama pod utjecajem tehnoloških i komunalnih otpadnih voda kod grada Knina (od TOV-D 2 do KR-KOV 5), čiji je raspon vrijednosti u obje sezone iznosio od 212 do 505  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , u odnosu na izvor gdje su vrijednosti od 179,6 do 195,9  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (Tablica 2). Električna vodljivost najviše ovisi o koncentraciji iona koji se nalaze u vodi te je pokazatelj opterećenja otpadnim vodama. Povišena vodljivost izmjerena je na postajama OR 3 u proljeće i jesen, KOV-D 4 u proljeće te KR-NIZ 6 i BU 7 u jesen, što ukazuje na utjecaj onečišćenja rijeke Krke uz grad Knin (Tablica 2).

Vrijednosti pH su na svim postajama unutar raspona od 7,45 do 8,24 te prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) potvrđuju vodu vrlo dobrog ekološkog stanja, osim na postaji uz ispuštanje tehnoloških voda (TOV-D 2), gdje pH od 7,11 ukazuje na vodu dobrog ekološkog stanja. Zabilježene su uobičajene vrijednosti oksido-redukcijskog potencijala (ORP) za slatkovodne ekosustave koje također potvrđuju vodu dobrog ekološkog stanja, a kreću se u rasponu od -13,5 do -59,5 mV u proljeće te u rasponu od 4,1 do -51,2 mV u jesen. Usporedbom vrijednosti *m*-alkaliteta između postaja uočavaju se usporedive vrijednosti na svim postajama, čiji je raspon od 2,98 do 4,53 (Tablica 2).

Koncentracije otopljenog  $\text{CO}_2$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) zabilježene na izvoru rijeke Krke su se kretale u rasponu od 2,27 do 2,81, dok su na postajama uz grad Knin i nizvodno (od TOV-D 2 do BU 7) vrijednosti usporedive, u proljeće u rasponu od 1,04 do 1,54, a u jesen od 1,10 do 2,0. Karbonatna (KT) i ukupna (UT) tvrdoća vode su usporedive između postaja, a maksimalna vrijednost je u obje sezone izmjerena u trenutku otpuštanja komunalnih otpadnih voda (KOV-D 4), 12,68 za KT, odnosno 13,46 za UT (Tablica 2). Općenito, vidljiva je niža ukupna tvrdoća, tipična za krške rijeke, u usporedbi s rijekama koje ne protječu krškim područjima. Na svim istraživanim postajama opažena su mala sezonska kolebanja fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode, a uočene varijabilnosti posljedica su razlika između postaja (Tablica 2).

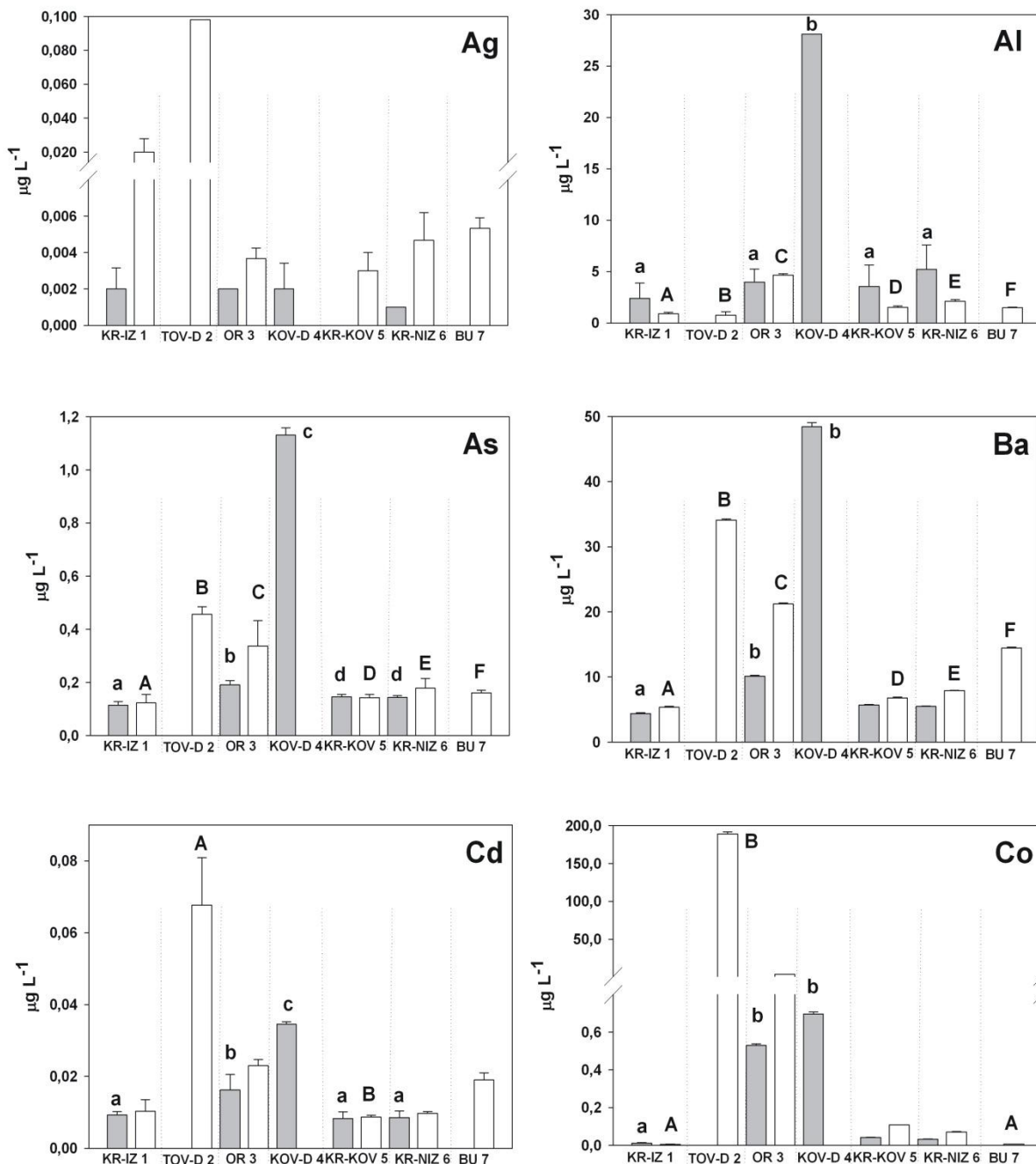
**Tablica 2** Vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode rijeke Krke uzorkovane na 7 lokacija u proljeće i jesen 2015. Označene su (podebljane i podcrtane) one vrijednosti koje su ispod dobrog ekološkog stanja vode prema klasifikaciji iz Uredbe o standardu kakvoće voda (NN 73/2013).

	KR-IZ (1)		TOV-D (2)	OR (3)		KOV-D (4)	KR-KOV (5)		KR-NIZ (6)		BU (7)
	proljeće	jesen	jesen	proljeće	jesen	proljeće	proljeće	jesen	proljeće	jesen	jesen
Zamućenost/ FAU	0	0	11	2	2	11	3	7	2	0	1
Temperatura vode/ °C	9,8	10,3	11,5	13,4	13,6	14,0	13,1	11,8	10,6	11,6	12,4
pH	7,96	7,53	7,11	8,07	7,57	7,45	8,24	7,77	8,09	7,82	8,09
<i>m</i> -alkalitet/ mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	2,98	3,95	3,30	3,56	3,54	4,53	3,87	3,29	3,42	3,31	3,29
Električna vodljivost/ μS cm <sup>-1</sup>	357	392	469	<b>551</b>	<b>843</b>	<b>1011</b>	430	461	423	<b>526</b>	<b>1011</b>
TDS <sup>1</sup> / mg L <sup>-1</sup>	179,6	195,9	235	275	422	505	215	230	212	263	505
ORP <sup>2</sup> / mV	-28,4	-19,7	4,1	-50,5	-21,8	-13,5	-59,5	-13,5	-50,6	-36,0	-51,2
Otopljeni kisik / mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	10,4	10,54	<b>4,68</b>	12,8	8,81	<b>0,13</b>	11,7	11,07	13,9	10,31	10,88
Zasićenje kisikom/ %	96,6	95,8	<b>44,0</b>	123,4	80,1	<b>1,3</b>	114,3	104,0	120,6	96,4	103,5
KPK <sup>3</sup> <sub>KMnO<sub>4</sub></sub> / mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	3,5	3,7	<b>32</b>	<b>42</b>	<b>18</b>	<b>47</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>8,1</b>	4,1	<b>7,4</b>
Otopljeni CO <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	2,27	2,81	1,10	1,12	1,23	1,04	1,27	1,14	1,54	2,0	1,28
Amonij/ mg N L <sup>-1</sup>	<0,1	<0,1	<b>0,45</b>	<b>0,22</b>	<b>0,30</b>	<b>0,31</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,14</b>	<b>0,10</b>	<b>0,15</b>
Ukupni dušik/ mg N L <sup>-1</sup>	0,3	0,4	<b>9,1</b>	<b>15,4</b>	<b>11,4</b>	<b>20,1</b>	<b>12,3</b>	<b>8,7</b>	<b>3,0</b>	0,7	<b>2,3</b>
Ukupni fosfor/ mg P L <sup>-1</sup>	<0,01	<0,01	<b>1,96</b>	<b>1,15</b>	<b>1,03</b>	<b>2,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,05</b>	<b>0,52</b>	<b>0,10</b>	<b>0,20</b>
Nitrati/ mg N L <sup>-1</sup>	0,1	0,1	<b>7,3</b>	<b>3,0</b>	<b>2,7</b>	<b>10,8</b>	<b>1,3</b>	<b>3,2</b>	<b>2,5</b>	0,2	<b>1,8</b>
Nitriti/ mg N L <sup>-1</sup>	0,006	0,004	<b>0,440</b>	<b>0,984</b>	<b>0,842</b>	<b>0,696</b>	<b>0,399</b>	<b>0,426</b>	0,010	0,100	0,008
Ortofosfati / mg P L <sup>-1</sup>	<0,01	<0,01	<b>0,98</b>	<b>0,14</b>	<b>0,11</b>	<b>1,04</b>	0,03	<b>0,63</b>	0,02	<0,01	0,01
KT/ °dH	8,34	11,6	9,24	9,97	9,80	12,68	10,84	9,21	9,58	9,26	9,21
UT/ °dH	10,21	11,83	12,62	10,77	11,12	13,46	11,32	12,84	10,68	11,31	10,97

<sup>1</sup>TDS – ukupno otopljene soli (eng. *Total Dissolved Salts*); <sup>2</sup>ORP – oksido-redukcijski potencijal; <sup>3</sup>KPK – kemijska potrošnja kisika

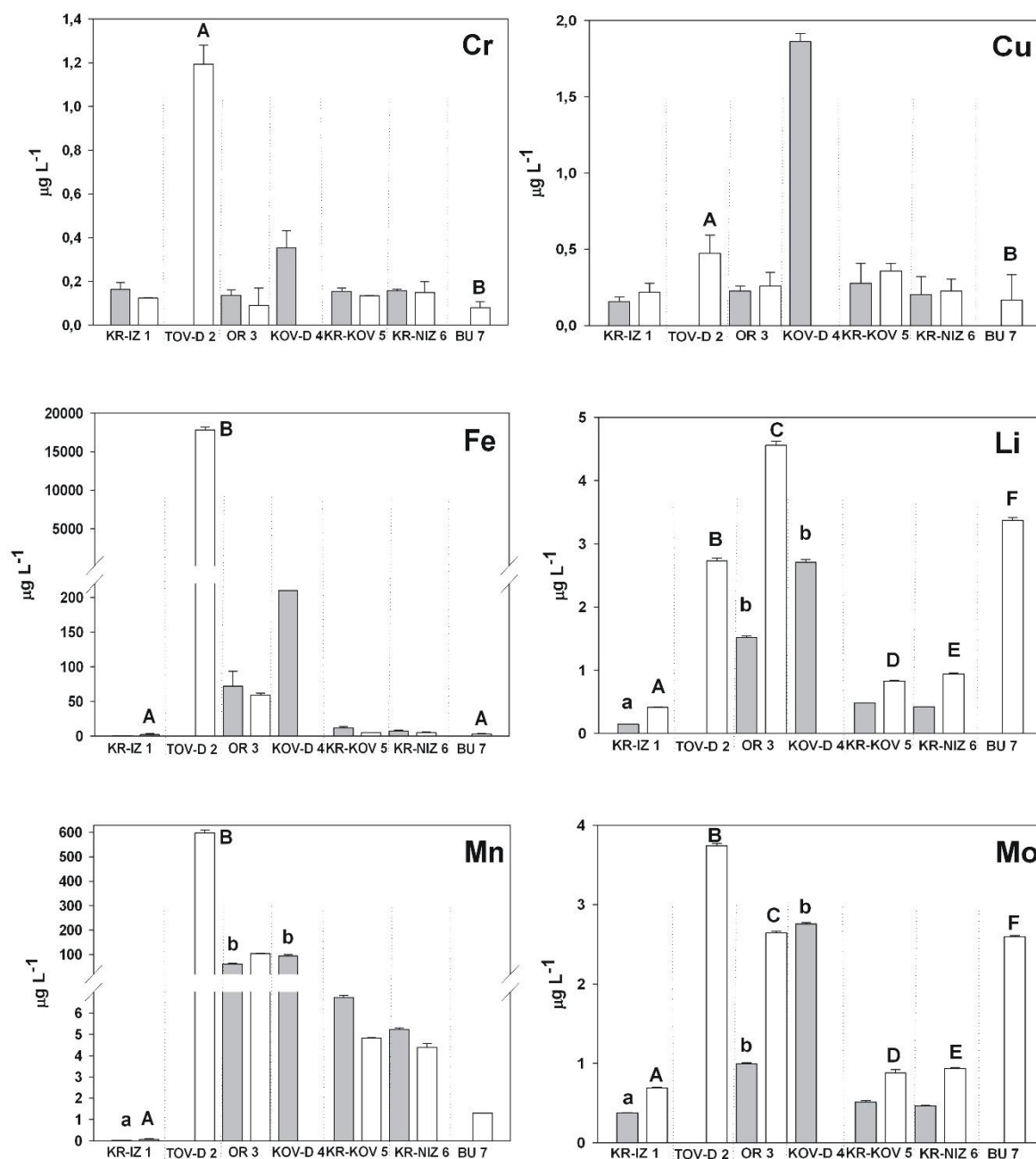
## 4.2 Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke

Usporedba koncentracija 21 mikroelementa i 4 makroelementa otopljenih u vodi rijeke Krke na sedam istraživanih lokacija ukazuje da svi izmjereni metali imaju najniže vrijednosti na referentnoj postaji - izvoru rijeke Krke (KR-IZ 1). Očigledan je antropogeni utjecaj koji rezultira povišenim koncentracijama metala u obje sezone na lokacijama koje su pod utjecajem točkastih izvora zagađenja grada Knina (TOV-D 2, OR 3, KOV-D 4, KR-KOV 5). U proljeće postoje statistički značajno povišene koncentracije metala na postajama OR 3 i KOV-D 4 u usporedbi s izvorom KR-IZ 1, i to za mikroelemente: As, Ba, Cd, Co, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Sb, V te za makroelemente: Ca, K, Mg, Na, dok su samo na postaji OR 3 statistički značajno povišeni Zn i Sr, a samo na KOV-D 4 Al i Ti (Slike 12 i 13). U jesen je provedeno dodatno uzorkovanje u bazenima s tehnološkim otpadnim vodama iz tvornice vijaka (TOV-D 2) te su između izvora (KR-IZ 1) i ove lokacije zabilježene najveće razlike u koncentraciji metala, statistički značajno za: As, Ba, Ca, Co, Fe, K, Li, Mn, Mo, Ni, Se, Sb i Zn. Srednje vrijednosti koncentracija metala na postaji TOV-D 2 u odnosu na KR-IZ 1 su povišene: 47000 puta za Co, oko 9000 puta za Mn i Fe, oko 5500 puta za Zn, 500 puta za Ni, 10-70 puta za K, Se i Sb te 3-7 puta za Li, Ba, Mo, As i Ca. Osim toga, koncentracije metala na postaji TOV-D 2 su bile značajno povišene i u odnosu na ostale postaje za sljedeće metale: As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Li, Mo i Sb (Slike 12 i 13). Uspoređujući koncentracije metala na postajama koje su nizvodno od točkastih izvora onečišćenja (KR-NIZ 6, BU 7) s postajama uz grad Knin (TOV-D 2, OR 3, KOV-D 4, KR-KOV 5), uočeno je da su u obje sezone koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi niže na nizvodnim postajama. Izuzetak je Sr, čije su koncentracije bile značajno povišene u rijeci Butišnici (BU 7) te su prelazile  $3000 \mu\text{g L}^{-1}$ , u odnosu na postaje TOV-D 2 i OR 3 gdje su koncentracije ispod  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  (Slika 12). Iako su niže u odnosu na postaje pod utjecajem otpadnih voda, koncentracije pojedinih metala na postaji 1 km nizvodno od utjecaja onečišćenja (KR-NIZ 6) su više u usporedbi s izvorom KR-IZ 1, odnosno 70-400 puta više srednje koncentracije u proljetnom i jesenskom razdoblju za Mn, 3-22 puta za Fe, Zn, Co i Ti, 2-3 puta za Sr, Al, Ni i Li. Međutim, za Ag, Cd, Cr, Rb i Tl su na istoj lokaciji (KR-NIZ 6) koncentracije bile iste ili čak niže od onih izmjerenih na izvoru (KR-IZ 1). Statistički značajno povišene koncentracije Al, As, Ba, Li, Mo, Sb, Sr, Mg i Ca zabilježene su u rijeci Butišnici (BU 7) u odnosu na izvor (KR-IZ 1) (Slike 12 i 13).

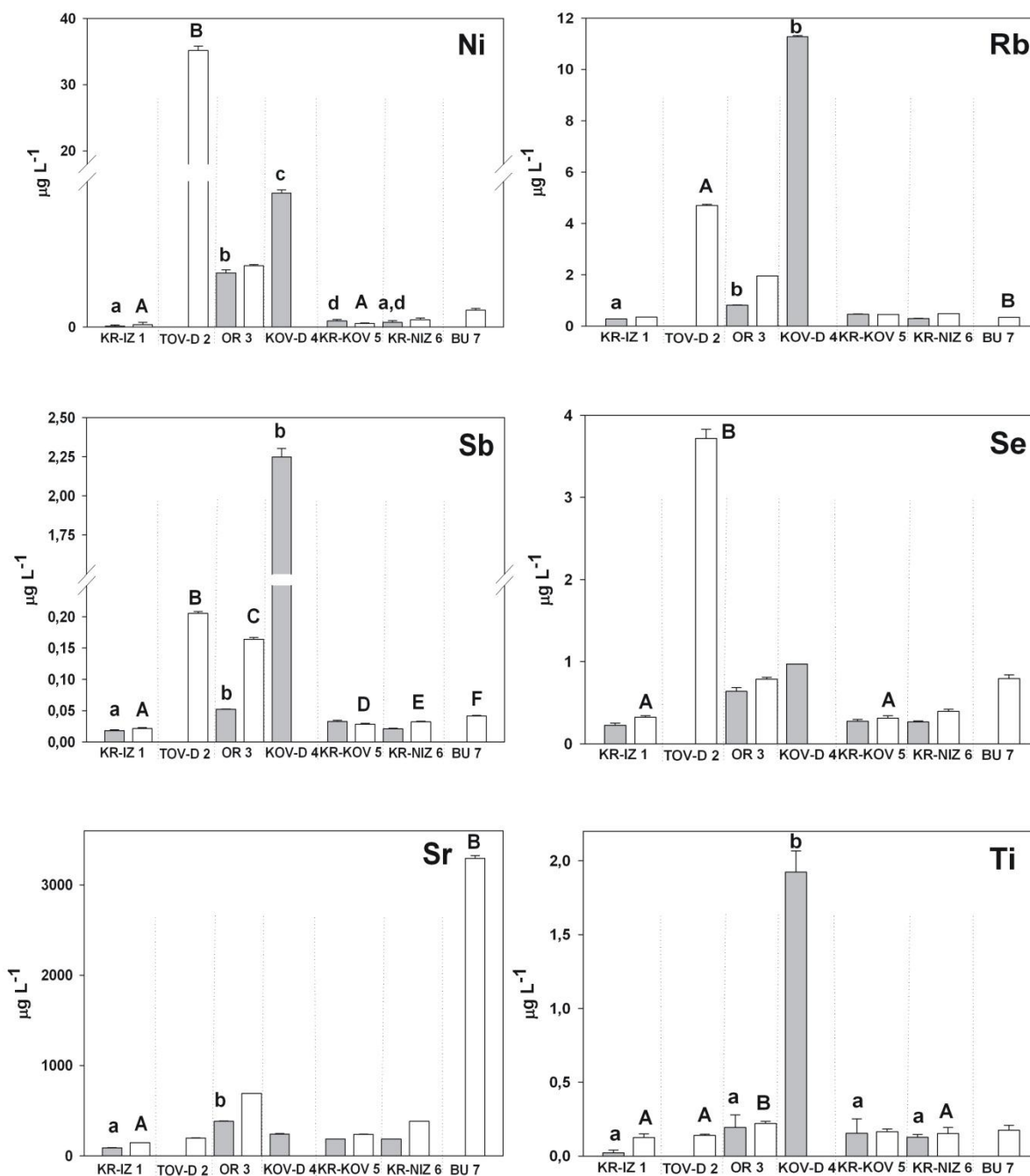


**Slika 12** Koncentracije ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ukupno otopljenih mikroelemenata (Ag, Al, As, Ba, Cd, Co) u vodi rijeke Krke na 7 istraživačkih postaja u proljeće (sivi stupci) i jesen (bijeli stupci). Istaknuta je statistički značajna razlika u koncentracijama metala između pojedinih postaja (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) različitim slovima (za proljeće: a, b, c, d, e, f; za jesen: A, B, C, D, E, F – isto slovo označava da ne postoji statistički značajna razlika, a različito da postoji).

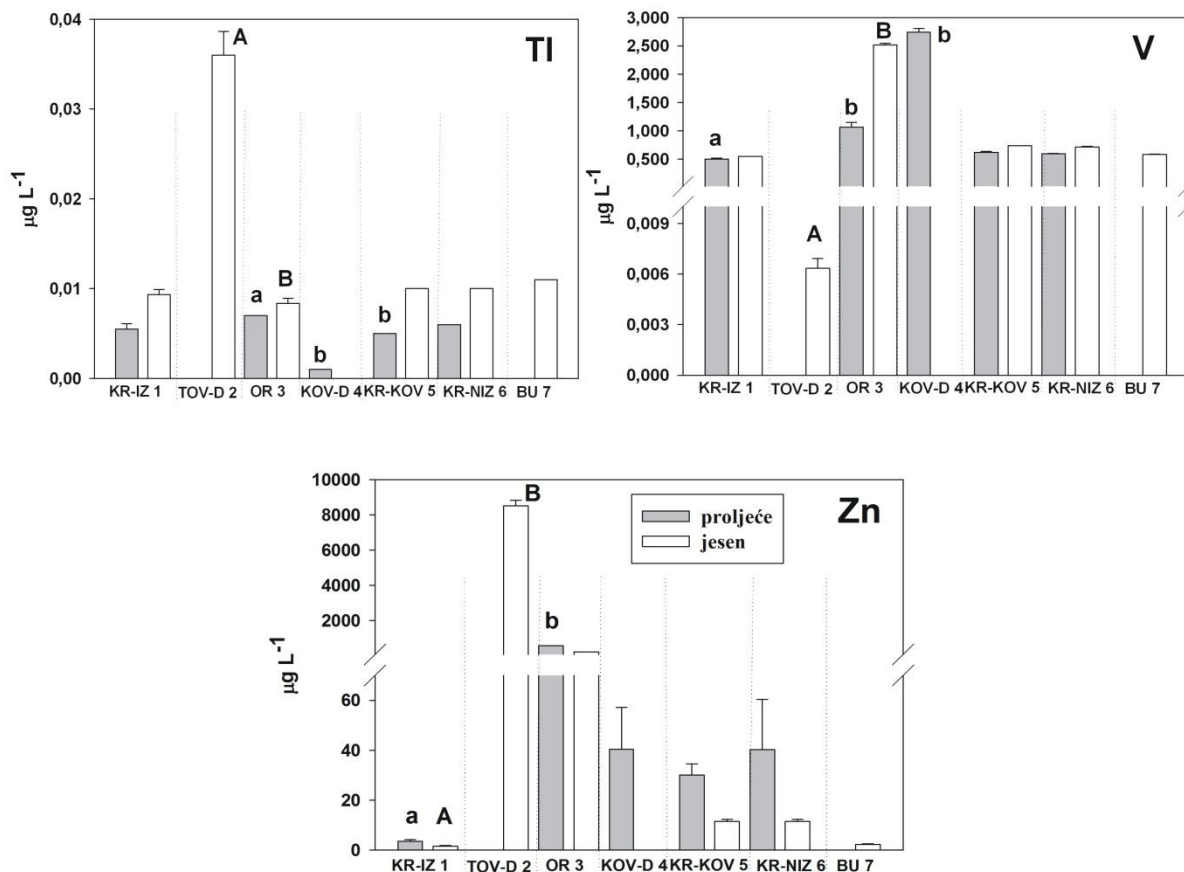




**Nastavak slike 12** Koncentracije ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ukupno otopljenih mikroelemenata (Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo) u vodi rijeke Krke na 7 istraživačkih postaja u proljeće (sivi stupci) i jesen (bijeli stupci). Istaknuta je statistički značajna razlika u koncentracijama metala između pojedinih postaja (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) različitim slovima (za proljeće: a, b, c, d, e, f; za jesen: A, B, C, D, E, F – isto slovo označava da ne postoji statistički značajna razlika, a različito da postoji).

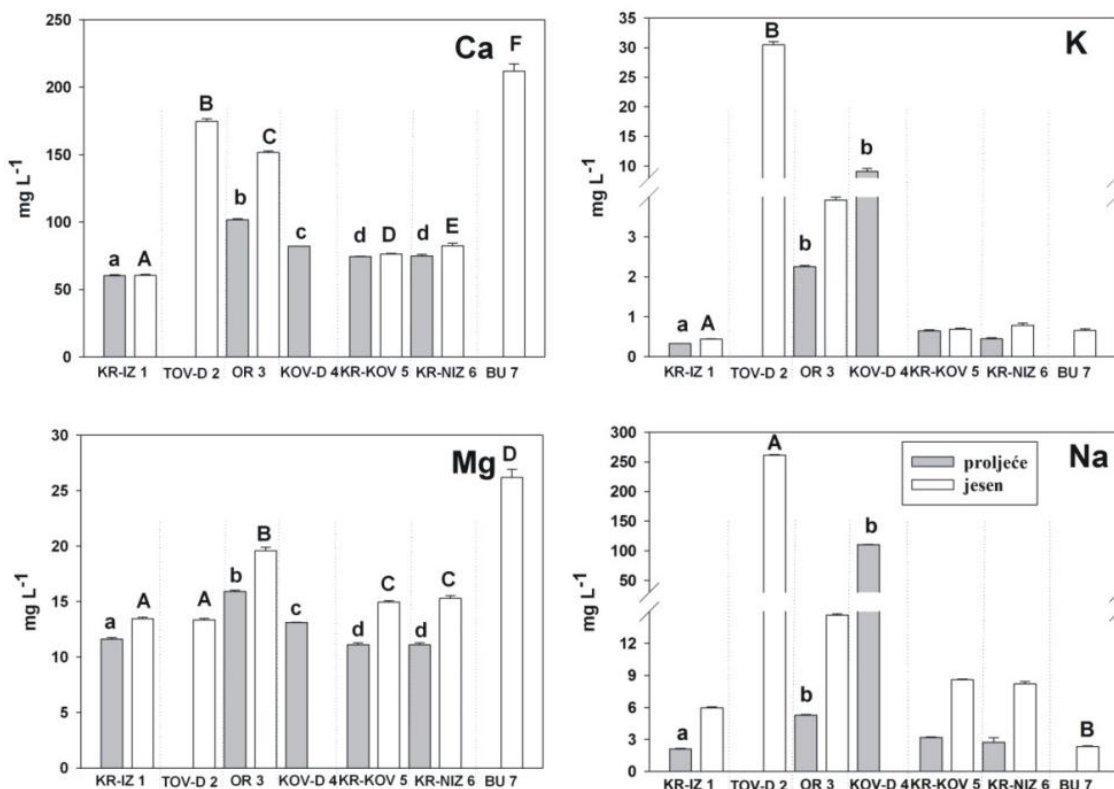


**Nastavak slike 12** Koncentracije ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ukupno otopljenih mikroelemenata (Ni, Rb, Sb, Se, Sr, Ti) u vodi rijeke Krke na 7 istraživačkih postaja u proljeće (sivi stupci) i jesen (bijeli stupci). Istaknuta je statistički značajna razlika u koncentracijama metala između pojedinih postaja (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) različitim slovima (za proljeće: a, b, c, d, e, f; za jesen: A, B, C, D, E, F – isto slovo označava da ne postoji statistički značajna razlika, a različito da postoji).



**Nastavak slike 12** Koncentracije ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ukupno ottopljenih mikroelemenata (Tl, V, Zn) u vodi rijeke Krke na 7 istraživačkih postaja u proljeće (sivi stupci) i jesen (bijeli stupci). Istaknuta je statistički značajna razlika u koncentracijama metala između pojedinih postaja (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) različitim slovima (za proljeće: a, b, c, d, e, f; za jesen: A, B, C, D, E, F – isto slovo označava da ne postoji statistički značajna razlika, a različito da postoji).

Usporedbom koncentracija metala između sezona na 4 lokacije (KR-IZ 1, OR 3, KR-KOV 5 i KR-NIZ 6) uočava se kako gotovo svi metali imaju statistički značajno povišene vrijednosti u jesen. Jedini metali koji nisu pokazali nikakve sezonske razlike na nijednoj od postaja su Cd i Cu. Za Ti, Cr i K razlike između sezona pronađene su samo na izvoru (KR-IZ 1), dok su za As pronađene samo u rijeci Orašnici (OR 3) (Slike 12 i 13).



**Slika 13** Koncentracije (mg L<sup>-1</sup>) ukupno otopljenih makroelemenata (Ca, K, Mg i Na) u vodi rijeke Krke na 7 istraživačkih postaja u proljeće (bijeli stupci) i jesen (sivi stupci). Istaknuta je statistički značajna razlika u koncentracijama metala između pojedinih postaja (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis, p<0,05) različitim slovima (za proljeće: a, b, c, d, e, f; za jesen: A, B, C, D, E, F – isto slovo označava da ne postoji statistički značajna razlika, a različito da postoji).

### 4.3 Biometrijski pokazatelji jedinki potočne pastrve

U svakoj sezoni su ulovljene 22 jedinke potočne pastrve na pojedinoj postaji uzorkovanja, uz izvor rijeke Krke i u dijelu vodotoka uz grad Knin te su im određeni osnovni biometrijski pokazatelji (Tablica 3). Vidljivo je da u proljeće niti jedan od pokazatelja nije statistički značajno različit između dviju postaja, no ipak se može uočiti nešto povišena ukupna dužina i masa jedinki te masa jetre i gonada ulovljenih u rijeci Krki uz grad Knin. U jesen je u riba uočena statistički značajna razlika između postaja za većinu biometrijskih pokazatelja, odnosno više vrijednosti za ukupnu dužinu i masu, masu jetre te kondicijski indeks u riba ulovljenih kod Knina, kao i za gonadosomatski indeks u riba iz izvora rijeke Krke (Tablica 3). U proljeće je kod izvora rijeke Krke ulovljen jednak broj ženskih i muških jedinki, a u jesen više mužjaka, dok je u dijelu toka uz grad Knin u obje sezone ulovljeno više ženki.

Sezonske razlike ukazuju na povišene vrijednosti gonadosomatskog indeksa u jesen na obje postaje, statistički značajno samo u riba s izvora rijeke Krke. Isti trend ima i kondicijski indeks riba ulovljenih na postaji kod Knina, s višim vrijednostima u jesen, dok je hepatosomatski indeks značajno viši u proljeće u riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke. Također, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između dviju sezona za masu jetre i ukupnu masu jedinki na postaji kod Knina, s povišenim proljetnim vrijednostima (Tablica 3).

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

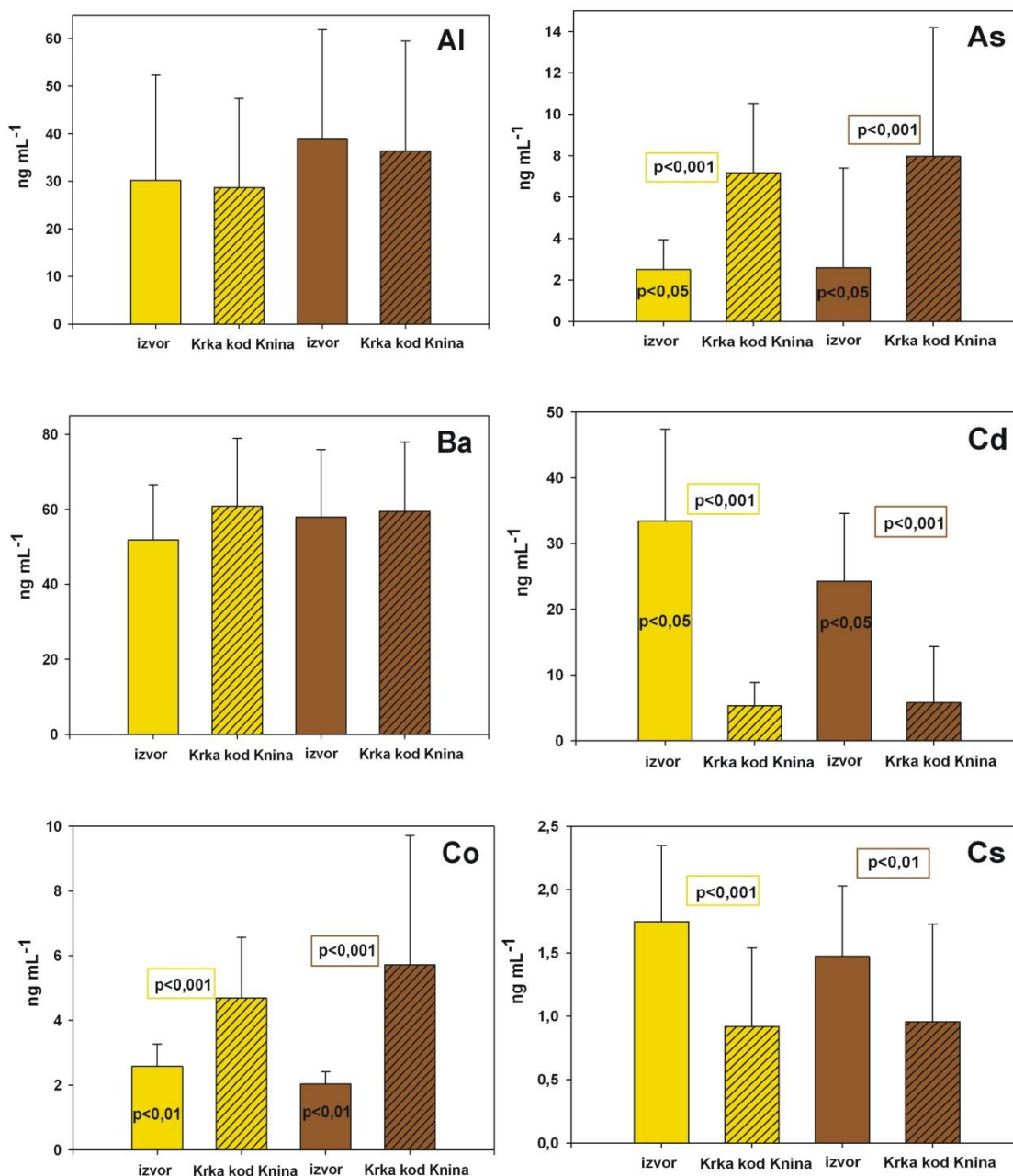
Biometrijski parametri	Izvor rijeke Krke		Dio toka rijeke Krke uz grad Knin		
	proljeće n=22	jesen n=22	proljeće n=22	jesen n=22	
<b>Ukupna dužina (cm)</b>	19,1 $\pm$ 4,8 (12,0 - 30,5)	18,3 $\pm$ 3,6 <sup>A</sup> (14,5 - 29,5)	21,9 $\pm$ 12,7 (10,5 - 58,0)	25,6 $\pm$ 4,8 <sup>B</sup> (15,0 - 37,0)	
<b>Ukupna masa (g)</b>	98,5 $\pm$ 80,9 (23,6 - 350,2)	78,8 $\pm$ 57,1 <sup>A</sup> (32,7 - 277,1)	268,1 $\pm$ 542,0 * (12,6 - 1870,0)	223,0 $\pm$ 121,1 *, <sup>B</sup> (40,4 - 598,0)	
<b>Masa jetre (g)</b>	1,4 $\pm$ 1,5 (0,27 - 5,3)	0,8 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup> (0,2 - 3,6)	3,5 $\pm$ 8,0 * (0,14 - 33,8)	3,1 $\pm$ 3,1 *, <sup>B</sup> (0,4 - 11,7)	
<b>Masa gonada (g)</b>	0,4 $\pm$ 0,3 (0,04 - 1,1)	3,5 $\pm$ 3,9 (0,1 - 14,8)	0,8 $\pm$ 1,8 (0,02 - 6,5)	7,6 $\pm$ 14,6 (0,1 - 47,5)	
<b>Spol</b>	♀	11	6	14	12
	♂	11	16	6	10
	ND	/	/	2	/
<b>Gonadosomatski indeks/ %</b>	0,4 $\pm$ 0,3 * (0,1 - 1,0)	4,3 $\pm$ 3,5 *, <sup>A</sup> (0,2 - 11,9)	0,2 $\pm$ 0,1 (0,03 - 0,5)	2,1 $\pm$ 3,4 <sup>B</sup> (0,07 - 11,6)	
<b>Hepatosomatski indeks / %</b>	1,3 $\pm$ 0,5 * (0,4 - 2,7)	1,0 $\pm$ 0,3 * (0,5 - 1,6)	1,2 $\pm$ 0,6 (0,9 - 3,5)	1,2 $\pm$ 0,7 (0,7 - 3,3)	
<b>Kondicijski indeks/ g cm<sup>-3</sup></b>	1,2 $\pm$ 0,3 (0,9 - 2,6)	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup> (1,0 - 1,3)	1,1 $\pm$ 0,2 * (0,2 - 1,4)	1,2 $\pm$ 0,1 *, <sup>B</sup> (1,0 - 1,5)	

ND – nije bilo moguće determinirati spol

#### 4.4 Koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve

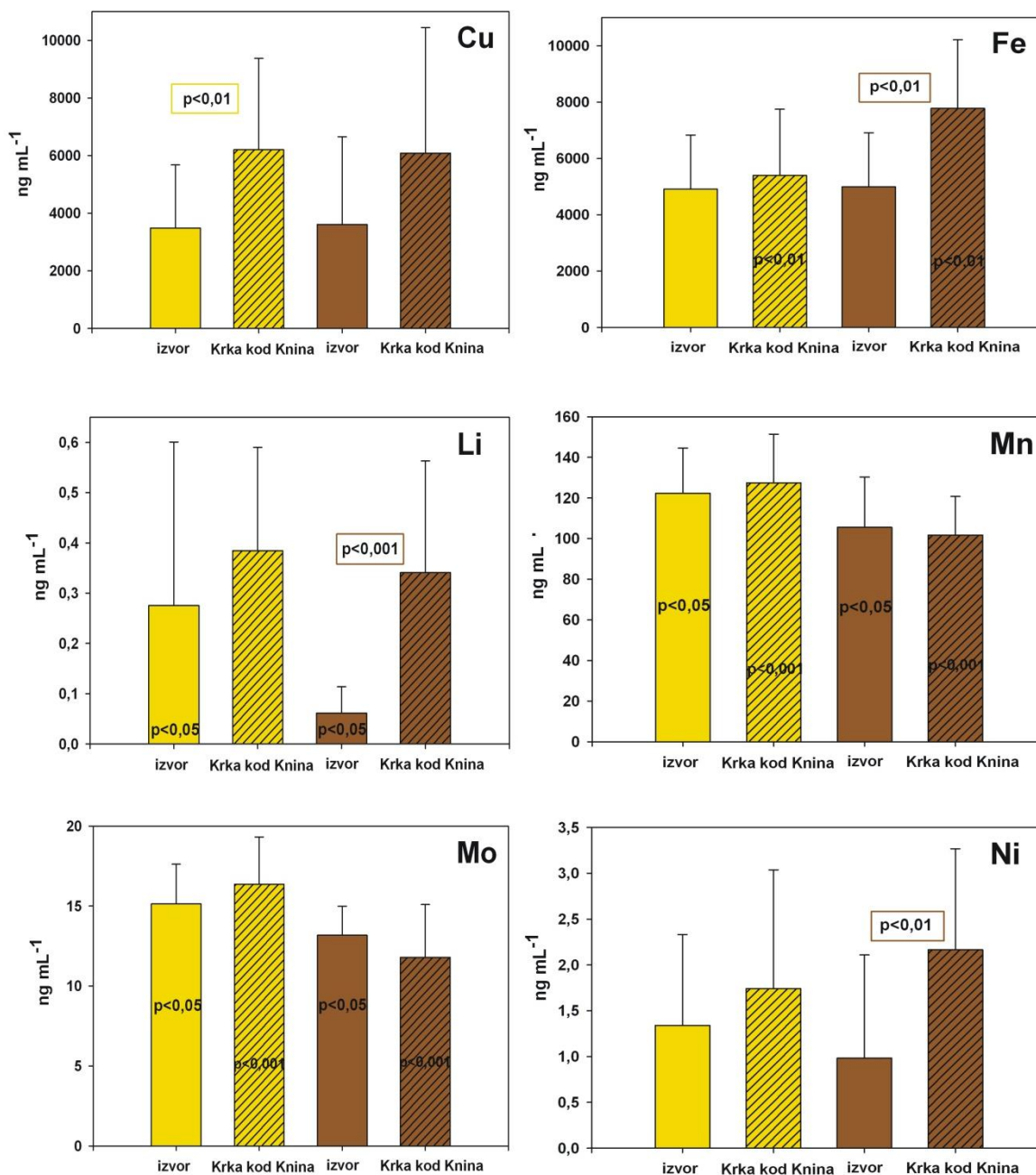
S obzirom da ukupna koncentracija određenog metala u vodi ne odražava biološki raspoloživu koncentraciju metala u organizmu, određeni su citosolski metali u jetri riba. Vidi se da su u proljeće koncentracije većine metala povišene u jetri riba koje obitavaju u rijeci Krki uz grad Knin u odnosu na ribe ulovljene kod izvora, statistički značajno za As, Co, Cu, Se, Sr i V (Slika 14). Suprotno, uočene su i više vrijednosti Al, Rb i Tl te značajno više Cd i Cs u riba ulovljenih u proljeće na izvoru rijeke Krke u odnosu na ribe iz Krke kod Knina. U jesen su statistički značajno povišene koncentracije metala u riba iz dijela toka kod grada Knina u odnosu na izvor za As, Co, Fe, Li, Ni, Pb, Sb, Sr, V i Zn (Slika 14). Na izvoru su zabilježene statistički značajno povišene koncentracije Cd, Cs, Rb, Tl i U u odnosu na postaju uz grad Knin (Slika 14). Koncentracije svih makroelemenata su usporedive između postaja u proljeće, dok je u jesen koncentracija K značajno viša u riba iz izvora rijeke Krke, a Na u riba iz dijela toka kod grada Knina (Slika 15).

Usporedbom koncentracija metala između sezona uočava se da veći broj metala ima povišene vrijednosti u proljetnom razdoblju uzorkovanja u odnosu na jesen na obje postaje (Slike 14 i 15). U riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke statistički značajno povišene vrijednosti u proljeće u usporedbi s jesenskim razdobljem postoje za mikroelemente Co, Cd, Li, Mo, Mn, Sb i Zn te za makroelemente Na i Mg, dok su jedino As i Tl bili značajno povišeni u jesenskom razdoblju u odnosu na proljeće. Koncentracije metala su kod grada Knina statistički značajno povišene za Mn, Mo, Tl, U, Ca i Mg u proljeće, a za Fe i Na u jesen (Slike 14 i 15). Usporedbom s koncentracijama metala u vodi, isti trend porasta koncentracija metala u vodi i citosolu jetre riba ulovljenih kod grada Knina u odnosu na ribe iz izvora rijeke Krke pronađen je za As, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Sb, Se, Sr, V i Zn u proljeće, te za As, Ba, Co, Cu, Li, Sb, Sr, V i Zn u jesen (Slike 12, 13, 14, 15).

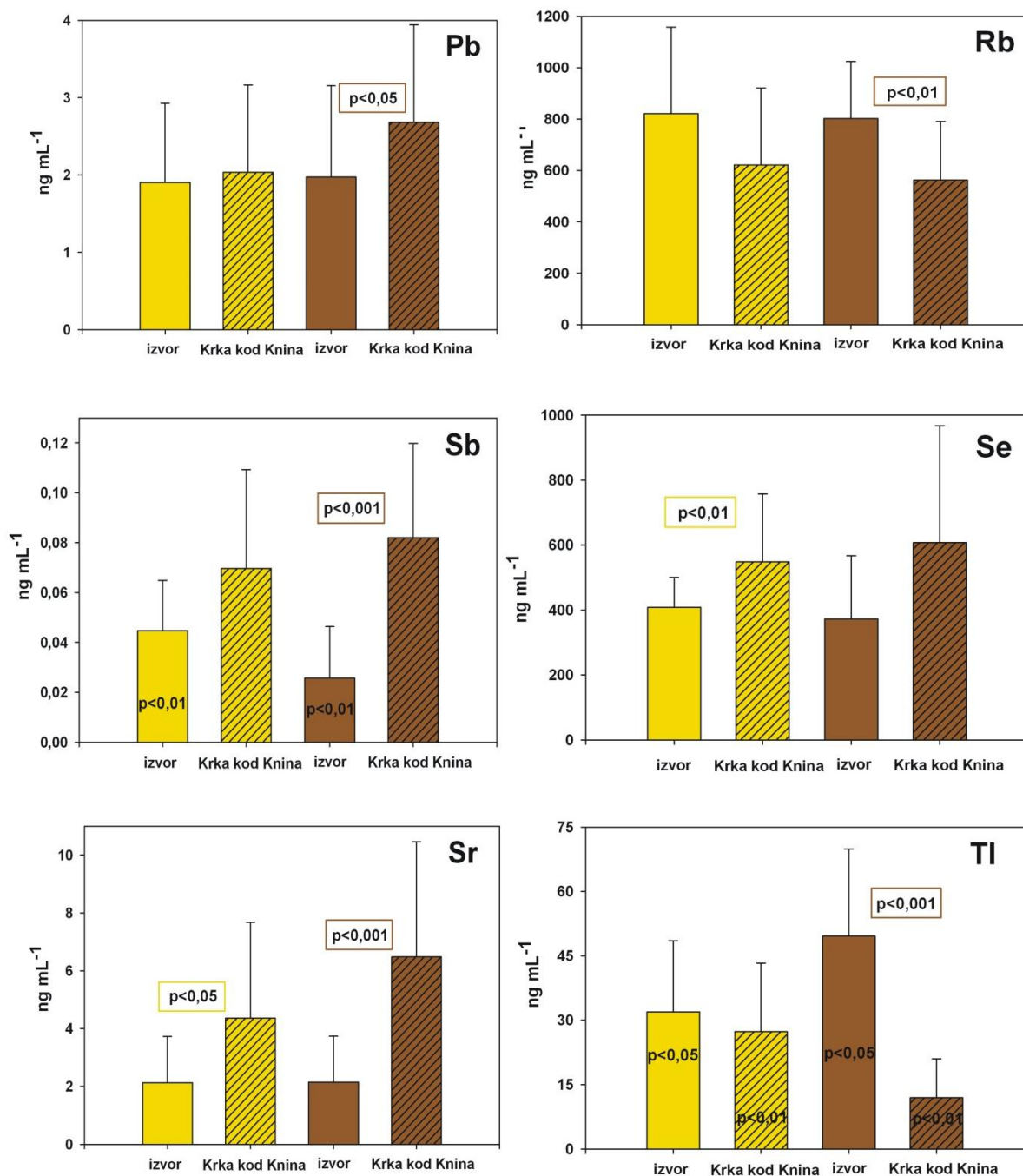


**Slika 14** Koncentracije (ng mL<sup>-1</sup>) mikroelemenata (Al, As, Ba, Cd, Co, Cs) izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potočne pastrve ulovljene u proljeće (žuti stupac) i jesen (smeđi stupac) na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina. Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.

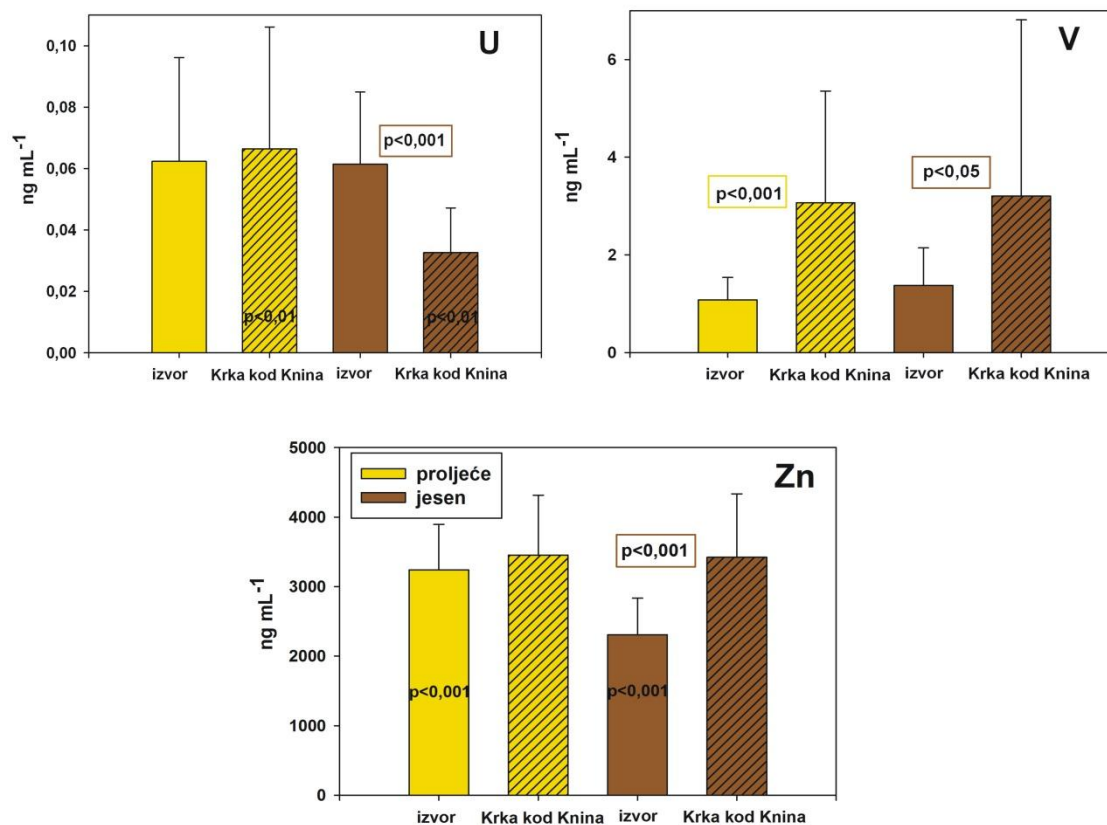




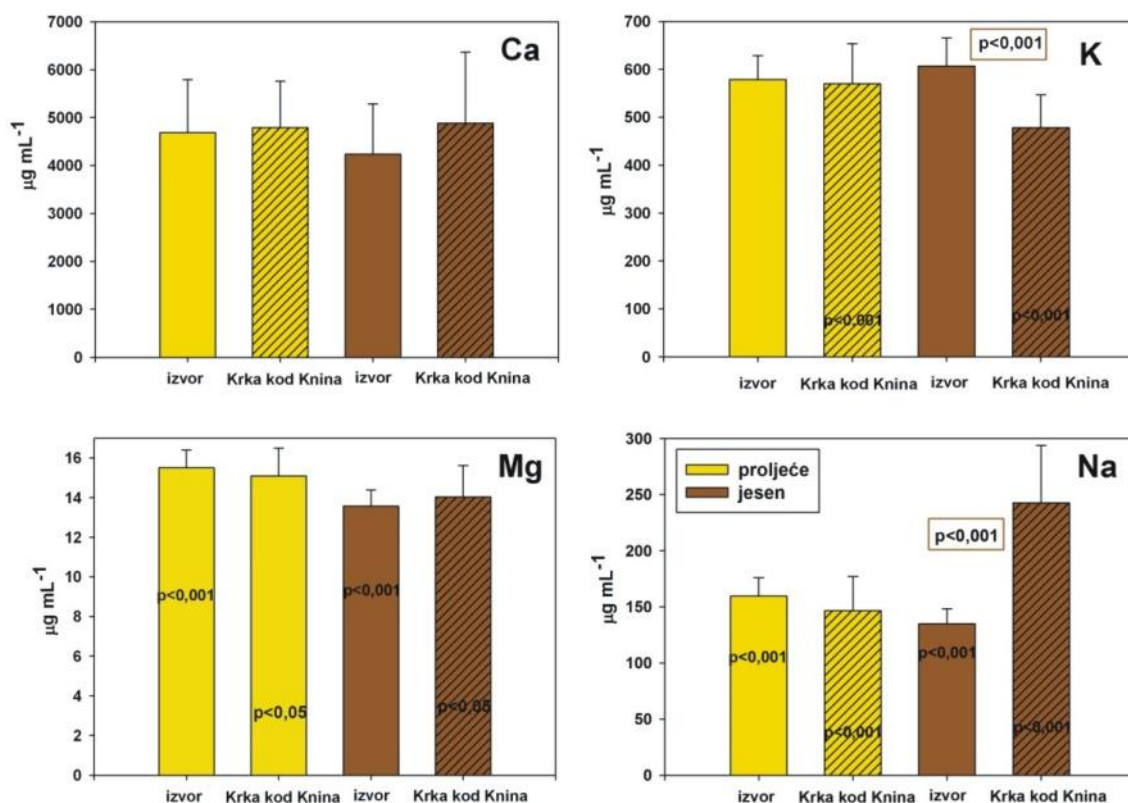
**Nastavak slike 14** Koncentracije (ng mL<sup>-1</sup>) mikroelemenata (Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni) izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potočne pastrve ulovljene u proljeće (žuti stupac) i jesen (smeđi stupac) na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina. Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.



**Nastavak slike 14** Koncentracije (ng mL<sup>-1</sup>) mikroelemenata (Pb, Rb, Sb, Se, Sr, Tl) izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potočne pastrve ulovljene u proljeće (žuti stupac) i jesen (smeđi stupac) na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina. Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.



**Nastavak slike 14** Koncentracije (ng mL<sup>-1</sup>) mikroelemenata (U, V, Zn) izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potočne pastrve ulovljene u proljeće (žuti stupac) i jesen (smeđi stupac) na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina. Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.



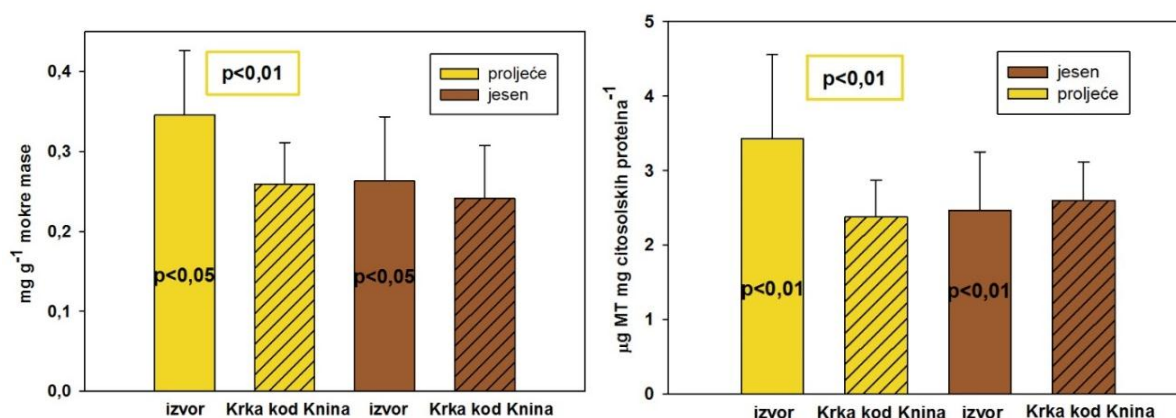
**Slika 15** Koncentracije ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) makroelemenata (Ca, K, Mg i Na) izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potodne pastrve ulovljene u proljeće (žuti stupac) i jesen (smeđi stupac) na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina. Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.

#### 4.5 Biomarkeri

Kako bi se pravovremeno ukazalo na stupanj izloženosti riba metalima u rijeci Krki, praćeni su biomarkeri, pokazatelji promjena na staničnom novou koji predstavljaju rani biološki odgovor organizma na promjene u okolišu. Stoga su u jetri riba ulovljenih u 2 sezone na izvoru rijeke Krke i na postaji uz grad Knin određeni MT kao biomarkeri izloženosti metalima, a kao biomarkeri općeg stresa organizma određeni su ukupni citosolski proteini.

#### 4.5.1 Koncentracije metalotioneina

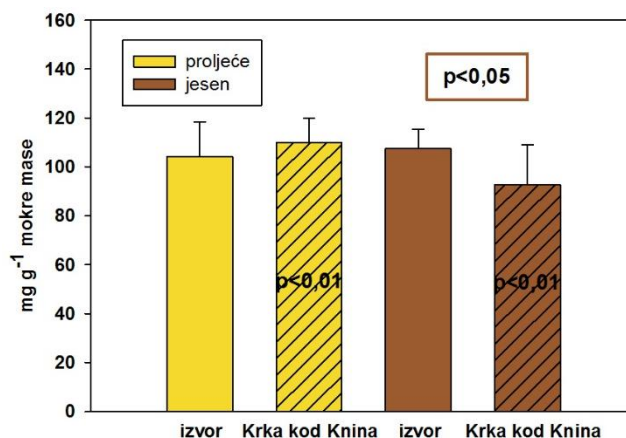
Koncentracije MT mogu se izraziti kao  $\text{mg g}^{-1}$  mokre mase jetre ili kao  $\mu\text{g mg}^{-1}$  ukupnih citosolskih proteina nakon dijeljenja s koncentracijom proteina. U oba slučaja u proljetnom razdoblju je ustanovljena značajno viša koncentracija MT (t-test,  $p < 0,01$ ) u potočnih pastrva ulovljenih kod izvora rijeke Krke u odnosu na dio toka uz točkaste izvore zagađenja kod grada Knina (Slika 16). U jesenskom razdoblju ne postoji značajna razlika u koncentraciji MT između dviju postaja. Usporedbom između sezona uočava se statistički značajno viša vrijednost MT u jetri riba ulovljenih na postaji uz izvor rijeke Krke u proljeće, dok u riba ulovljenih u području uz grad Knin nema sezonskih razlika (Slika 16).



**Slika 16** Koncentracije MT izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina u proljeće i jesen (srednja vrijednost i S.D.): a) koncentracije MT izražene kao  $\text{mg g}^{-1}$  mokre mase b) koncentracije MT izražene kao  $\mu\text{g MT mg}^{-1}$  citosolskih proteina. Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.

#### 4.5.2 Koncentracije ukupnih citosolskih proteina

Usporedbom koncentracija ukupnih citosolskih proteina u jetri potočnih pastrva iz rijeke Krke ustanovljena je statistički značajna razlika između postaja u jesen, odnosno značajno više vrijednosti u riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke u usporedbi s postajom kod grada Knina ( $p < 0,05$ , t-test) (Slika 17). U proljeće je zabilježen suprotan trend, s neznatno povišenim koncentracijama citosolskih proteina u dijelu vodotoka rijeke Krke kod grada Knina u usporedbi s izvorom, ali bez statističke značajnosti. Sezonske razlike u koncentraciji citosolskih proteina u jetri potočnih pastrva su značajne samo u riba ulovljenih kod grada Knina, s povišenim vrijednostima u proljeće u odnosu na jesensko razdoblje ( $p < 0,01$ , t-test) (Slika 17).



**Slika 17** Koncentracije ukupnih citosolskih proteina ( $\text{mg g}^{-1}$  mokre mase) izmjerene u jetri potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina u proljeće i jesen (srednja vrijednost i S.D.). Statistički značajna razlika (t-test) između postaja istaknuta je iznad stupaca, a između sezona unutar stupaca.

## 5 RASPRAVA

Zaštita slatkovodnih staništa jedna je od ključnih zadaća današnjice, s obzirom da ona spadaju među najugroženije ekosustave na svijetu, a broj slatkovodnih vrsta je u posljednjih 50 godina smanjen za više od 80% (Izvešće o stanju planeta, WWF). Zbog ljudskih aktivnosti mnoga slatkovodna staništa su u opasnosti od nestajanja zbog onečišćenja, regulacije vodotoka i uništavanja staništa, izgradnje brana i akumulacija, navodnjavanja ili prekomjerne uporabe vode u industriji. Krška područja su posebno osjetljiva jer se zagađenje voda zbog hidrogeoloških značajki tog područja brzo širi. Rijeka Krka sa svojim pritocima čini sustav kompozitnih dolina u kršu (Perica i sur., 2007) te predstavlja neprocjenjivo nacionalno prirodno bogatstvo i ekosustav s brojnim endemičnim, rijetkim i ugroženim svojstama. Dio toka rijeke Krke proglašen je nacionalnim parkom u svrhu zaštite i očuvanja hidroloških, geomorfoloških i pejzažnih vrijednosti krajobraza, posebice sedrenih slapova koji su njegov temeljni fenomen. Međutim, ove vrijednosti su danas ugrožene zbog brojnih ekoloških problema, poput neracionalnog gospodarenja vodnim resursima, uništavanja okoliša neprimjerenom izgradnjom, a posebice zbog onečišćenja vode raznim organskim i anorganskim tvarima. Tvornica vijaka smještena uz grad Knin ispušta bez adekvatnog pročišćavanja industrijske otpadne vode u bazene uz rijeku Krku, što predstavlja potencijalnu opasnost za očuvanje vrlo dobrog i dobrog ekološkog stanja. Otpadne industrijske i nepročišćene komunalne vode grada Knina su u Planu upravljanja Nacionalnim parkom "Krka" (2011) prepoznate kao prijetnja vrijednostima Nacionalnom parku Krka, no unatoč tome nije donesen nijedan akcijski plan kojim bi se pokušalo riješiti taj problem.

U ovom istraživanju provedena je sveobuhvatna procjena kakvoće dijela vodotoka rijeke Krke koji je izvrgnut intenzivnim i nedovoljno kontroliranim antropogenim utjecajima, a smješten je 500 m od grada Knina i 2 km od granice Nacionalnog parka Krka. Provedeni monitoring obuhvaćao je praćenje niza fizikalno-kemijskih parametara kakvoće vode, koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi te biološke i ekotoksikološke pokazatelje u potočnoj pastvi. Praćenje bioloških promjena na staničnoj razini organizma tj. biomarkera služi kao rani pokazatelj antropogenih učinaka na vodene organizme te istovremeno može omogućiti pravovremeno poduzimanje mjera zaštite Nacionalnog parka Krka. S obzirom da ukupna koncentracija određenog metala u vodi ne odražava biološki

raspoloživu koncentraciju metala, određene su i koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve, kao frakciji u kojoj su bioraspoložive koncentracije metala. Također, biomonitoring je proveden je sezonski kako bi se utvrdilo postoje li značajne razlike između sezona (proljeće i jesen) za sve izmjerene parametre te kako bi se razlučili abiotički i biotički utjecaji od antropogenih na koncentracije metala u vodi te na biološke promjene koje se prate u potočnoj pastrvi kao indikatorskom organizmu.

### **5.1 Procjena kakvoće vode s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike**

Analiza kakvoće vode vrlo je važna za očuvanje i zaštitu prirodnih ekosustava (Pawar i Shembekar, 2012). Istraživanje različitih fizikalno-kemijske čimbenika vrlo je važno za razumijevanje metaboličkih događaja u vodenom ekosustavu. Postoji vrlo malo podataka o fizikalno-kemijskim čimbenicima u krškim rijekama. Do sada su za rijeku Krku provedena tri istraživanja koja su obuhvatila fizikalno-kemijske čimbenike (Jukić i sur., 2006; Cukrov i sur., 2007; Cukrov i sur., 2008). U ovom istraživanju, svi fizikalno-kemijski čimbenici izmjereni na izvoru rijeke Krke (KR-IZ 1) pokazali su da je voda na tom području vrlo dobrog ekološkog stanja prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013), dok je na nizvodnim postajama uočeno pogoršanje kakvoće vode. Uzorci vode uzeti direktno iz bazena s tehnološkim otpadnim vodama iz tvornice vijaka, kao i iz ispusnih cijevi komunalnih otpadnih voda bili su za gotovo sve čimbenike ispod dobrog ekološkog stanja. Kakvoća vode u području nizvodno od točkastih izvora zagađenja grada Knina (KR-NIZ 6) je također za većinu čimbenika ispod dobrog ekološkog stanja (Tablica 2).

#### **5.1.1 Temperatura vode**

Temperatura vode je jedan od najvažnijih ekoloških čimbenika koji ima značajan utjecaj na životne procese u vodi te na raznolikost života u njoj. Stoga je vrlo važno kontinuirano praćenje temperaturnih vrijednosti na vodenim staništima (Pawar i Shembekar, 2012). Izmjerena temperatura u rijeci Krki ne ukazuje na odstupanje od prosjeka. S obzirom da se njezino glavno vrelo nalazi se u špilji neposredno ispod sedrene barijere slapa Krčića (Žugaj i Marković, 1990) ova rijeka ponornica prolazi kroz podzemlje te nije pod utjecajem sunčeve topline što dokazuju i zabilježene niže vrijednosti



temperature na izvoru. Na postaji nizvodno, uz grad Knin, izmjerena je za nekoliko stupnjeva viša temperatura. Kao posljedica međuovisnosti tektonskih odnosa i hidrogeoloških karakteristika stijena, u donjem dijelu porječja rijeke Krke korito rijeke je šire i pliće zbog postojanja dolinskih proširenja, a brzina vodnog toka manja pa se voda brže zagrijava. Mogući uzrok povišene temperature su i ispusti otpadnih komunalnih voda grada Knina u vodotok rijeke Krke u kojima je izmjerena za oko 4 °C viša temperatura u odnosu na izvor (KR-IZ 1) i područje nizvodno od utjecaja onečišćenja (KR-NIZ 6) (Tablica 2). Ovi podaci usporedivi su s prethodnim istraživanjima, gdje je prosječna vrijednost temperature na izvoru rijeke Krke tijekom četverogodišnjeg istraživanja iznosila oko 10 °C, a u blizini grada Knina 12 °C (Cukrov i sur., 2008). Također, porast temperature u blizini grada Knina zabilježili su u svom istraživanju Cukrov i sur. (2007), gdje se temperatura vode u blizini grada Knina kreće u rasponu od 8,7 do 15,3 °C, dok je na izvoru bila u rasponu od 9,0 do 10,4 °C. Jukić i sur. (2006) zabilježili su na postaji u blizini grada Knina srednju temperaturu 11,1 °C (min 7,8 °C, max 16,7 °C), a na izvoru rijeke Krke 10,4 °C (min 6,0 °C, max 11,3 °C).

### **5.1.2 Zamućenje vode**

Čimbenici koji utječu na proces zamućenja vode su koncentracija čestica u vodi, veličina čestica i valna duljina ulaznog zračenja. Ključnu ulogu pri zamućenju vode krških izvora igra cirkulacija vode kroz mrežu krških provodnika (Bonacci, 2016). S obzirom da mutnoća predstavlja značajan izvor degradiranja kakvoće vode, mjerenja zamućenja iznimno su važna u nadzoru kakvoće pitke vode, kao i otpadnih i industrijskih voda. U ovom istraživanju uočen je porast zamućenja s 0 FAU na izvoru rijeke Krke, odnosno 2-7 FAU uz grad Knin, na 11 FAU zabilježenih tijekom otpuštanja otpadnih komunalnih i tehnoloških voda u rijeku Krku (Tablica 2). Povećanje zamućenja je dokaz unosa veće koncentracije suspendiranih tvari i mikroorganizama u vodu, koji potječu iz nepročišćenih otpadnih voda. Zamućenje može uzrokovati manji prodor svjetlosti u vodu te onemogućiti rast i razvoj algi i podvodnog višeg bilja, kao i ometati dezinfekciju te osigurati okolinu za rast mikroorganizama (GLOBE, 2003). Osobitu pažnju treba posvetiti kontroli zamućenja u krškim područjima jer je pokazano kako sedimenti prolaskom kroz podzemlje krških područja na svom putu apsorbiraju teške metale, radioaktivne minerale, toksične organizme i mikroorganizme (Bonacci, 2016).

### 5.1.3 pH i oksido-redukcijski potencijal

pH vrijednost utječe na većinu kemijskih procesa u vodi te određuje strukturu životnih zajednica. Većina jezera i tekućica ima pH između 6,5 do 8,5, a to su optimalni uvjeti za život većine biljnih i životinjskih vrsta. Zbog prisutnosti elektrolita kiselog i bazičnog karaktera koji narušavaju ravnotežu između ( $H^+$ ) i ( $OH^-$ ) iona prirodne vode su rijetko neutralne. Prirodne vode s nižim pH vezane su za područja s određenom podlogom (npr. sulfidi), dok su vode na vapnenačkim podlogama prirodno bazične (GLOBE, 2003). Sve kopnene vode mogu se, prema pH-vrijednosti, podijeliti na dva osnovna tipa: vode neutralno-alkalične reakcije i vode kisele reakcije. Prvoj skupini pripadaju vode u kojima pH vrijednost rijetko pada ispod 6, a u nizu slučajeva povisi se i do 10. Drugoj skupini pripadaju vode s pH vrijednošću manjom od 5 (Tolić, 2013). Prema navedenoj podjeli, vode rijeke Krke spadaju u neutralno-alkalične vode. Na svim postajama zabilježene su vrijednosti pH oko 8 (Tablica 2), što je optimalno za djelotvornu biološku produktivnost. Viši pH karakterističan je za krške rijeke, koje tu vrijednost održavaju stalnom zbog velikog puferskog kapaciteta kojem pridonosi kalcijev i magnezijev karbonat iz podloge (Giller i Malmqvist, 1998). Prilikom otpuštanja tehnoloških i komunalnih otpadnih voda zabilježene su nešto snižene pH vrijednosti, kao posljedica organskog zagađenja, povišenih koncentracija hranjivih soli te fekalnih i heterotrofnih bakterija. Ipak, ove blago snižene pH vrijednosti prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) ne ukazuju na pogoršanje ekološkog stanja vode. Izmjerene pH vrijednosti su usporedive s vrijednostima dobivenim u prethodnim istraživanjima: 7,5 na izvoru rijeke Krke i 8 u blizini grada Knina (Cukrov i sur., 2008); 7,42 na izvoru te 7,79 kod grada Knina (Jukić i sur., 2006). Sezonske varijacije pH nisu vidljive, kao ni u istraživanju koje su proveli Cukrov i sur. (2008).

Vrijednosti oksido-redukcijskog potencijala vode rijeke Krke su negativne i stoga uobičajene za slatkovodne sustave. Negativan ORP je izmjeren na svim postajama, osim u tehnološkim otpadnim vodama iz tvornice vijaka (Tablica 2). Negativne vrijednosti ORP su tipične za izvorske vode te ukazuju na reduciranu vodi bogatu elektronima.

#### 5.1.4 Alkalitet

Alkalitet čine hidroksidi, karbonati i bikarbonati alkalijskih i zemnoalkalijskih metala, uglavnom Na, K, Ca i Mg, ali i ioni prisutni u nižim koncentracijama poput silikata, amonijaka i fosfata. U rijeci Krki zabilježen je izrazito nizak alkalitet (Tablica 2), što pokazuje da je ovaj ekosustav vrlo osjetljiv jer veliki unos kiseline (kisele kiše, otpadne vode) može privremeno potrošiti sav alkalitet te dovesti do pada pH. Nizak pH je opasan za većinu organizama u vodi te je stoga važno sustavno pratiti ekološko stanje rijeke Krke. Cukrov i sur. (2008) su na izvoru rijeke Krke zabilježili alkalitet 4,6, a kod grada Knina 4,8, dok je u provedenom istraživanju raspon m-alkaliteta na obje postaje u obje sezone malo nižih vrijednosti i iznosi od 2,98 do 4,53.

#### 5.1.5 Ukupno otopljene soli i vodljivost

Prirodne vode imaju veću vodljivost ukoliko se nalaze na podlozi od topljivih stijena (npr. vapnenac), a sukladno tome nižu vodljivost na granitnoj podlozi (GLOBE, 2003). Povećanjem ukupno otopljenih tvari u vodi povećava se i električna vodljivost te je njihov proporcionalni odnos zabilježen i u rijeci Krki. Vrijednosti električne vodljivosti vode su najviše na postajama pod utjecajem otpadnih komunalnih voda grada Knina i tehnoloških voda tvornice vijaka DIV d.o.o., što se može objasniti visokim koncentracijama TDS-a na tom području (Tablica 2). Povišenje vodljivosti je zabilježeno i u rijeci Butišnici, što je posljedica poljoprivrednih djelatnosti. Ovakvi podaci potvrđuju pogoršanje kakvoće vode rijeke Krke uz grad Knin. Visoka vodljivost zabilježena je u Brljanskom jezeru u Nacionalnom parku Krka te je također povezana s utjecajem onečišćenja, posebice otpadnih voda grada Knina (Poljak, 2012).

#### 5.1.6 Otopljeni ugljični dioksid, karbonatna i ukupna tvrdoća vode

Ugljični dioksid ulazi u vodu iz atmosfere i nastaje kao produkt biokemijskih procesa. Također, voda se prolaskom kroz humusno tlo koje je bogato CO<sub>2</sub> obogaćuje ugljičnim dioksidom. Povećanjem temperature vode smanjuje se topljivost CO<sub>2</sub> u vodi čime se smanjuje količina hidrogenkarbonata u vodi, a ravnoteža se pomiče u smjeru taloženja CaCO<sub>3</sub> (Tolić, 2013). Posljedica toga procesa je smanjenje karbonatne tvrdoće

vode te je vidljivo da su CO<sub>2</sub> i karbonatna tvrdoća usko povezani. O količini mineralnih soli ovisi tvrdoća vode, pa se razlikuje: karbonatna, nekarbonatna, kalcijeva, magnezijeva i ukupna tvrdoća.

Vode se prema tvrdoći mogu podijeliti na meke, lagano tvrde, umjereno tvrde, tvrde i jako tvrde vode (URL 2). Prema toj podjeli rijeka Krka pripada kategoriji umjereno tvrdih voda jer joj se tvrdoća kreće u rasponu od 8-14 °dH (Tablica 2). Niža tvrdoća je karakteristična za krške rijeke jer one brzo protječu kroz dobro topive karbonatne stijene u usporedbi s rijekama kod kojih se voda dugo zadržava u karbonatnim aluvijalnim tlima čija je tvrdoća jako velika. Smanjenje koncentracije otopljenog CO<sub>2</sub> od izvora rijeke Krke nizvodno (Tablica 2) opaženo je i u istraživanju krških rijeka u Nacionalnom parku Plitvička jezera (Barešić, 2009). Naime, visoka koncentracija CO<sub>2</sub> u izvorima krških rijeka posljedica je prolaska podzemnih voda kroz tlo, pri čemu otapa CO<sub>2</sub> nastao razgradnjom biljaka u humusu i tako postaju prezasićene s CO<sub>2</sub>. Izlaskom na površinu takva voda, zbog velike prezasićenosti u odnosu na atmosferu, naglo gubi CO<sub>2</sub>, a proces isplinjavanja se pojačava u nizvodnom toku i na slapovima te pospješuje taloženje kalcijevog karbonata. Koncentracija CO<sub>2</sub> smanjuje se nizvodno i zbog trošenja u procesu fotosinteze (Barešić, 2009). Općenito, krške rijeke u odnosu na rijeke koje ne protječu krškim područjima sadrže malo otopljenog CO<sub>2</sub>, što je pokazano i u ovom istraživanju.

### 5.1.7 Režim kisika

Topljivost plinova u tekućinama uvelike je pod utjecajem temperature, pa tako što je viša temperatura, topljivost kisika bit će manja. Prema tome, porastom temperature smanjit će se koncentracija otopljenog kisika u vodama (moru, rijekama, jezerima itd.), kao i nivo zasićenosti vode kisikom. Kisik ima veliku važnost u vodenoj sredini budući da o njemu ovise mnogi životno važni procesi. Brzotekuće i turbulentne rijeke, poput Krke, u gornjim tokovima sadrže veću koncentraciju otopljenog kisika, a temperatura vode im je niža, dok vode srednjih i donjih tokova rijeka sadrže nižu koncentraciju otopljenog kisika te je temperatura vode viša. Optimalna koncentracija kisika u vodi (mg L<sup>-1</sup>) za hladnovodne vrste riba, poput potočne pastrve, je iznad 7, a za toplovodne iznad 5. Bez dovoljne količine kisika život u vodi nije moguć za većinu biljnih i životinjskih vrsta. Salmonidne vrste pokazuju znakove gušenja kod koncentracije kisika niže od 3 mg L<sup>-1</sup>, a

ciprinidne kada se koncentracija kisika smanji na 1,5 - 2,0 mg L<sup>-1</sup> (Debeljak, 1982). Prilikom otpuštanja komunalnih otpadnih voda izmjerena je koncentracija 0,13 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Tablica 2), što ukazuje na ugroženost normalnih životnih uvjeta potočnih pastrva u rijeci Krki. Snižene koncentracije otopljenog kisika kod grada Knina zabilježili su Cukrov i sur. (2007), pri čemu su se koncentracije otopljenog kisika na izvoru rijeke Krke kretale u rasponu od 10,0 do 11,5, a kod grada Knina rasponu od 6,6 do 12,2 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Slične rezultate dobili su i Jukić i sur. (2006), zabilježivši koncentraciju otopljenog kisika na izvoru rijeke Krke u rasponu od 7,90 do 11,80 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, a kod grada Knina 6,10 do 12,10 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

Voda koja je zasićena kisikom ne sadrži u sebi organsku materiju i obratno - nazočnost malih količina kisika ili njegova odsutnost znači da je voda zagađena organskom materijom (Andreis i Slemenšek, 2003). U rijeci Krki zabilježen je pad zasićenosti kisika prilikom ispuštanja industrijskih otpadnih voda, a drastičan pad na samo 1,3 % zabilježen je prilikom ispusta komunalnih otpadnih voda grada Knina (Tablica 2). Dobiveni rezultati ukazuju na zagađenost vodenog ekosustava te na značajno pogoršanje ekološkog stanja rijeke Krke. Količina i potrošnja otopljenoga kisika u vodi ukazuje na eventualnu prisutnost mrtve organske tvari, koja troši kisik prilikom procesa razgradnje. Organska tvar se prirodno nalazi u vodi (mrtvi biljni i životinjski organizmi), no njezina količina se može povećati ispuštanjem u vodu iz antropogenih izvora (npr. kanalizacija). Izmjerene vrijednosti KPK na gotovo svim postajama nizvodno od izvora rijeke Krke ukazuju na značajnu potrošnju kisika i pogoršanje ekološkog stanja vode zbog intenzivnog antropogenog unosa organske tvari (Tablica 2).

### **5.1.8 Hranjive tvari**

Prisustvo dušikovih spojeva u vodi najčešće ukazuje na činjenicu da je ta voda u jačoj ili slabijoj mjeri zagađena. Najveći dio dušika i njegovih spojeva u vodi rezultat je aktivnosti bakterija i cijanobakterija, dok dušik iz atmosfere predstavlja relativno mali dio (Tolić, 2013). Dušikovi spojevi ukazuju na organsko zagađenje vode te na stupanj procesa mineralizacije organske tvari (tj. oksidacije proteina). Raspadanjem uginulih životinjskih organizama dolazi do cijepanja kompleksnijih dušikovih spojeva na jednostavnije spojeve (redukcija). Amonijak je jedan od najvažnijih indikatora zagađenja vodenih sustava te

njegove veće količine u vodi upućuju na prisustvo otpadnih ili fekalnih voda. Količina amonijaka u vodi je u normalnim uvjetima vrlo mala zbog njegove adsorpcije i oksidacije u nitrite i nitrate. Za vodene organizme toksična je samo nedisocirana molekula amonijaka. Amonijak, koji u vodi nastaje kao produkt raspadanja organskih materija, vrlo otrovno djeluje na centralni živčani sustav svih vrsta riba (Tolić, 2013).

Prisutnost velikih količina nitrita u ispitivanoj vodi ukazuje na djelomičnu razgradnju ili svježije organsko onečišćenje (Tolić, 2013), dok nitrati ukazuju da se radi o starome zagađenju (Piria, 2007). Primjenom umjetnih gnojiva u poljoprivredi, povećava se količina nitrata u tlu, a ispiranjem iz tla kišama dolaze u jezera, rijeke i mora (GLOBE, 2003). Kanalizacijski ispusti su drugi štetan izvor nitrata u vodi, što dovodi do preopterećenja vodenog ekosustava, odnosno eutrofikacije. Fosfor se u prirodnim i otpadnim vodama nalazi uglavnom u obliku fosfata. Oni se mogu podijeliti na ortofosfate, kondenzirane fosfate i organski vezane fosfate (Tolić, 2013). Fosfati u vodama javljaju se iz različitih izvora. Primjerice, sredstava za čišćenje koja sadrže fosfor mogu biti izvor velike količine polifosfata u prirodnim vodama. Isprana mineralna gnojiva iz poljoprivrednih površina najveći su izvor ortofosfata u potocima i rijekama (Piria, 2007). Organski fosfor dospijeva u vodene sustave ekskrecijom vodenih organizama i otpadnim vodama. Fosfati su neophodni za rast i razvoj biljaka i životinja, no previše fosfata u vodi dovodi do eutrofikacije (Tolić, 2013).

Povećane koncentracije nitrita, nitrata, ortofosfata, ukupne količine otopljenog fosfora, amonijaka i dušika u rijeci Krki ukazuju na organsko onečišćenje uslijed ispuštanja komunalnih i industrijskih otpadnih voda kod grada Knina. Na temelju izmjerenih vrijednosti hranjivih soli, koje su znatno više od graničnih vrijednosti kategorija dobrog ekološkog stanja prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013), može se zaključiti kako je u rijeci Krki došlo do značajnog pogoršanja kakvoće vode uslijed antropogenog utjecaja kod grada Knina. Međutim, koncentracije nitrata, nitrita i ukupnog dušika nizvodno od Knina ukazuju na vodu dobrog ekološkog stanja što može ukazivati na prirodni potencijal samopročišćavanja rijeke Krke (Cukrov i sur., 2008). Procjena ekološkog stanja vode rijeke Krke ukazuje na stalan antropogeni izvor onečišćenja te na potrebu kontinuiranog monitoringa ovog dijela rijeke Krke.

## 5.2 Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke

Prisutnost metala u tragovima i njihova specijacija važan su čimbenik u procjeni kakvoće vode. Metali u tragovima sastavni su dio minerala koji tvore tlo i stijene. Inspiranjem i trošenjem stijena mogu prirodno dospjeti u vode i atmosferu, ali mogu nastati i antropogenim djelovanjem. Izgaranjem fosilnih goriva i rudarenjem oslobađa se veći dio metala u atmosferu odakle oborinama dopijevaju u površinske vode u otopljenom obliku ili adsorbirani na partikularne organske tvari (Barešić, 2009). Direktni unos metala u vodene tokove moguć je industrijskim otpadnim vodama, procjednim vodama iz odlagališta otpada, poljoprivrednim ili komunalnim ispustima te podzemnim vodama. Iako su metali neophodan čimbenik u vodenom okolišu jer u mnogim slučajevima o njima ovisi i bioraznolikost vodenog ekosustava, njihova prisutnost u koncentracijama višim od optimalnih može imati različite toksične učinke na žive organizme u vodi, a posredno i na čovjeka. Zbog svoje postojanosti, visoke toksičnosti i sklonosti da se akumuliraju u ekosustavu, teški metali su opasni za sve žive organizme. Gotovo da ne postoje vode koje ne sadrže teške metale, poput olova, žive i kadmija, a ovi metali imaju toksični učinak pri vrlo niskim koncentracijama.

Prirodne koncentracije metala u tragovima u rijekama ovise o vrsti stijena, kao i tlu na slivnom području rijeke. Također, koncentracije metala ovise o spojevima u kojima su vezani, kao i o afinitetu za stvaranjem kompleksa s anorganskim (hidroksid, fosfat, sulfat, itd) i organskim ligandima. Otopljeni organski ugljik (DOC, eng. *Dissolved Organic Carbon*) je izuzetno važan za transport metala u vodenim sustavima. Metali formiraju snažne komplekse s otopljenim organskim ugljikom, pri čemu se povećava topljivost metala, a smanjuje njihova bioraspoloživost (Barešić, 2009). Sediment može djelovati kao mjesto akumulacije metala u tragovima, a najveći afinitet vezanja na kalcit imaju Cd, Zn, Mn, Co, Ni, Ba i Sr. Međutim, razni biogeokemijski procesi mogu dovesti do njihove remobilizacije u vodeni stupac te tako značajno povisiti njihovu koncentraciju do toksične razine za vodene organizme (Fichet i sur., 1998). S obzirom da su u hrvatskim krškim rijekama prirodne koncentracije metala u tragovima vrlo niske, dovoljan je i mali antropogeni unos da im se koncentracija poveća i za nekoliko redova veličine (Cukrov i sur., 2007). Također, zbog specifične geomorfologije i hidrologije krškog područja, izvor zagađenja može imati utjecaj tek kilometrima dalje putem dobro razvijene mreže

podzemnih tokova (Cukrov, 2008). Stoga je vrlo važno pratiti njihove koncentracije u svim dijelovima riječnog ekosustava od izvora do ušća, uzimajući u obzir vodostaj te utjecanje podzemnih voda i pritoka (Cukrov i sur., 2007).

U ovom istraživanju su tijekom proljetnog razdoblja zabilježene povišene koncentracije ukupno 19 otopljenih metala u ispustu komunalnih otpadnih voda kao i u Orašnici, pritoci rijeke Krke koja teče u blizini tvornice vijaka DIV d.o.o., u odnosu na izvor. Partikularne organske čestice iz nepročišćenih komunalnih voda imaju ulogu nosača metala, odnosno doprinose njihovoj adsorpciji. U jesenskom razdoblju uočene su statistički značajno povišene koncentracije 13 metala na postaji uz ispust tehnoloških otpadnih voda u usporedbi s izvorom, dok su za 9 metala bile značajno povišene u odnosu na ostale postaje. Koncentracije metala tijekom otpuštanja tehnoloških voda iz tvornice vijaka DIV d.o.o. bile su veće u odnosu na izvor: 47000 puta za Co, oko 9000 puta za Mn i Fe, oko 5500 puta za Zn, 500 puta za Ni, 10-70 puta za K, Se i Sb te 3-7 puta za Li, Ba, Mo, As i Ca. Metali za koje je zabilježen najveći porast koncentracije na postajama pod antropogenim utjecajem su: Co, Mn, Fe, Zn i Ni, a njihove povišene koncentracije zabilježene su čak i 1 km nizvodno od izvora onečišćenja (Slika 12). Za izradu vijaka često se upotrebljavaju legure nikla s bakrom, čelik (legura Fe i C) i mjed (legura Cu i Zn) (Alar, 2015). Također, proizvode se od niskolegiranih Mo-, Mo-Cr- ili Mo-Cr-V-čelika (Ćorić, 2016). U čelične legure se često dodaje Ni i V koji povećavaju otpornost materijala te se na površinu nanosi i Ti kako bi se spriječila korozija, dok se u mjedene legure dodaje Fe, Mn, Ni, Al i Si (Lositskii i sur., 1966). Pregledom materijala od kojih se proizvode vijci u tvornici DIV d.o.o., ustanovljeno je kako je većina izrađena od A2 i A4 inoxa (nehrđajućeg čelika), Zn, Br, Ni i Fe (URL 3). Nehrđajući čelik je legura Fe i najmanje 12 % Cr, dok moderni nehrđajući čelici sadrže i do 30% Cr. Izmjereni porast koncentracija metala u vodi rijeke Krke uz tvornicu vijaka DIV d.o.o. potvrđuje kako je upravo ova tvornica točkasti izvor unosa metala u rijeku Krku.

Prethodna istraživanja rijeke Krke također su pokazala značajan porast koncentracija metala u tragovima uz grad Knin u odnosu na izvor. Tako su Cukrov i sur. (2008) zabilježili na postaji nizvodno od grada Knina povišene koncentracije metala u usporedbi s izvorom: 60 puta za Zn, 25 puta za Pb, 4 puta za Cu i 2 puta za Cd. Međutim, srednje koncentracije Cd, Cu i Zn bile su niže u usporedbi s podacima dobivenim u ovom



istraživanju. Istražujući prostornu i vremensku raspodjelu Cd, Cu, Pb, Zn i Hg u rijeci Krki, Cukrov i sur. (2007) zabilježili su povećanu koncentraciju Zn, Pb i Hg i povezali je s antropogenim utjecajem ispusta otpadnih voda na tom području. Prema Direktivi 2008/105/EZ, prosječne godišnje koncentracije (eng. AA-EQS, Average Annual Environmental Quality Standards) metala u vodi za Ni iznose  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , za Cd  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ , za Pb  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , a za Hg  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Koncentracije Cd ( $0,008-0,009 \mu\text{g L}^{-1}$ ) i Ni ( $0,08-0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ ) izmjerene u području pod utjecajem onečišćenja grada Knina niže su od ovih vrijednosti, što potvrđuje da iako povišene u odnosu na izvor rijeke Krke, koncentracije ovih metala ipak ne prelaze uobičajene vrijednosti u prirodnim vodama.

Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi bile su u obje sezone niže na postajama koje su nizvodno od točkastih izvora onečišćenja u odnosu na postaje uz grad Knin. Ovaj trend može se objasniti sposobnošću samopročišćavanja koju posjeduju rijeke s vapnenačkom podlogom, visokim pH i alkalitetom (Korfali i Davies, 2005). Cukrov i sur. (2008) opisali su u rijeci Krki proces samopročišćavanja koji utječe na smanjenje povišenih koncentracija metala u tragovima. Ovaj proces odvija se preko manjih kaskadnih jezera, gdje sedimentacija i precipitacija rezultiraju značajnim smanjenjem koncentracija metala. Također, procesu samopročišćavanja doprinosi i znatan podzemni utok čistih podzemnih voda (Cukrov i sur., 2008). Sličan trend opadanja koncentracije teških metala u nizvodnom toku zabilježen je u Nacionalnom parku Plitvička jezera. Naime, Omanović i sur. (2007) su mjerenjem toksičnih elemenata u tragovima (Zn, Cd, Pb, Cu i Hg) u vodama Plitvičkih jezera uočili da su njihove koncentracije općenito vrlo niske. Najviše vrijednosti izmjerene su na izvorima Crne i Bijele rijeke, a u nizvodnom toku dolazi do pada koncentracija jer se ti elementi putem talože, što ukazuje na to da elementi u tragovima dopijevaju u jezera ispiranjem stijena i tla u kojima su prirodno prisutni u određenim koncentracijama.

Osim razlika između postaja, uočene su i sezonske razlike u koncentracijama metala te su svi metali imali značajno povišene vrijednosti u jesen u odnosu na proljeće, čemu je vjerojatno uzrok niži vodostaj rijeke Krke, koji je na jesen, 30.9.2015., iznosio 87 cm, dok je na proljeće, 21.4.2015., iznosio 142 cm (Baze hidroloških podataka HIS 2000 Državnog hidrometeorološkog zavoda). Naime, kako razina vode pada, povećava se koncentracija teških metala u ekosustavu, zbog čega se u jesenskom razdoblju, nakon

ljetnih suša, uočava viša koncentracija teških metala. Obiakor i sur. (2013) navode kako je sezona glavni čimbenik koji utječe na koncentraciju teških metala u slatkovodnom ekosustavu. Emoyan i sur. (2006) također su zabilježili varijabilnost koncentracija teških metala sa sezonom. Povećanje vrijednosti metala u jesen može se također pripisati smanjenju kapaciteta slatke vode da prirodno filtrira povećani dotok svježe kopnene vode iz susjednih vodenih tijela, koja ispuštaju zagađivače u rijeku (Obiakor i sur., 2013). U istraživanju sezonskih varijacija 16 teških metala u rijeci Han u Kini, Li i Zhang (2010) su uočili da su najniže koncentracije metala prisutne u proljeće, dok je u razdoblju od 6. do 11. mjeseca većina metala imala povišene vrijednosti, što objašnjavaju sezonskim razlikama toka te poljoprivrednim aktivnostima.

Iz svega navedenog vidljiv je trend porasta koncentracija metala od izvora prema točkastim izvorima zagađenja grada Knina, odnosno ispustu tehnoloških otpadnih voda tvornice vijaka DIV d.o.o. te gradskom ispustu komunalnih otpadnih voda, koji varira ovisno o sezoni. Zbog nepostojanja adekvatnih uređaja za pročišćavanje, otpadne vode značajno doprinose porastu koncentracija metala u vodi rijeke Krke, koje su ipak još u razinama karakterističnim za prirodne vode.

### **5.3 Biološke promjene u potočnoj pastrvi**

Analiza pojedinih čimbenika kakvoće vode ukazuje na trenutno stanje vodene sredine, no organizmi koji tu obitavaju djeluju kao bioindikator i svojim fiziološkim /patofiziološkim stanjem projiciraju trenutna zbivanja u njoj, ali i ona od prije nekoliko tjedana, mjeseci ili godina (Čož-Rakovac i sur., 2000). U riječnim ekosustavima ribe su česti indikatorski organizmi izloženosti metalima i kakvoće vode jer se nalaze na vrhu hranidbenog lanca. Također, pogodne su i kao kralješnjaci zbog slične fiziologije sa sisavcima (Catsiki i Strogyloudi, 1999). Kao indikatorski organi često se koriste bubrezi, škrge i jetra. Jetra je organ koji sudjeluje u pohranjivanju i detoksikaciji metala i čija se metabolička funkcija može poremetiti zbog prisustva toksičnih metala (Filipović Marijić, 2004). Kakvoća vode u kojoj riba živi vrlo je važna za njezin opstanak. Riba živi u određenom rasponu osnovnih parametara (temperatura, kisik, pH, amonijak, organska tvar, tvrdoća vode) unutar kojih mogu nesmetano funkcionirati pa svako prekoračenje optimalnih uvjeta dovodi do promjene njihovog fiziološkog statusa (Čož-Rakovac i sur.,

2000). Tjelesna temperatura riba ovisi o temperaturi okolišne vode pa su samim time njihove fiziološke funkcije i imunološki sustav pod utjecajem promjena temperature u okolišu (Lamková i sur., 2007). Osim koncentracije biološki dostupnih metala u vodenom okolišu i abiotičkih pokazatelja (temperatura, otopljeni kisik, intenzitet svjetlosti), značajan utjecaj na količinu akumuliranih metala imaju i biotički pokazatelji (fiziološko stanje riba, uvjeti ishrane), spol, biometrija (dužina i masa) te starost riba) (Livingstone, 1993). Teški metali uzrokuju oštećenja unutrašnjih organa, slabljenje imunološkog sustava, promjenu krvnih parametara, smanjuju vitalnost organizma, sposobnost prilagodbe i otpornost na bolesti (Staniskiene i sur., 2006). Također, akutno izlaganje teškim metalima izaziva hipertrofiju i nekrozu epitela škrga, dok kronično izaziva hiperplaziju epitela s posljedično respiratornim smetnjama te oštećenjima bubrega i jetre (Čož-Rakovac i sur., 2000).

Kondicija je čimbenik koji kod riba ukazuje na njihovo fizičko stanje, a posljedica je dužinsko-masenog odnosa. Izražava se kondicijskim indeksom čije vrijednosti pokazuju razlike u masi pri istim dužinama tijela ribe. Povezan je sa starošću, spolom, zrelošću gonada, punoćom želuca riba, kao i nizom drugih biološko-ekoloških čimbenika znakovitih za pojedinu vrstu. Hepatosomatski indeks pokazuje odnos mase jetre i mase tijela. Za određivanje gonadosomatskog indeksa koristi se odnos mase gonada i mase tijela te njegove vrijednosti ukazuju na trajanje sezone mrijesta.

U proljeće niti jedan od biometrijskih pokazatelja nije bio statistički značajno različit između izvora rijeke Krke i dijela toka pod antropogenim utjecajima uz grad Knin. Međutim, u jesen su uočene značajno povišene vrijednosti za ukupnu dužinu i masu, masu jetre te kondicijski indeks u riba ulovljenih kod Knina. Usporedba općeg stanja riba (kondicijski, hepatosomatski, gonadosomatski indeks) u razdoblju nakon (proljeće) i prije mrijesta (jesen) pastrva iz rijeke Krke ukazuje na sezonske razlike. Vrijednosti gonadosomatskog indeksa bile su povišene u jesen na obje postaje, statistički značajno samo u riba s izvora rijeke Krke, što ukazuje da su započele fiziološke promjene karakteristične uz mrijest koji je u potočne pastrve tijekom zime. Kondicijski indeks riba ulovljenih na postaji kod Knina je također imao više vrijednosti u jesen. Hepatosomatski indeks značajno je viši u proljeće u riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke, što se povezuje s povećanim hranjenjem i metaboličkom aktivnošću. U prethodnim istraživanjima dokazano je kako razlika u masi, reproduktivnom stadiju i starosti riba može doprinijeti razlikama u biološkom odgovoru organizma. Tijekom razdoblja mrijesta, značajno

povišene koncentracije metala i proteina rezultat su povećane ishrane riba (viši kondicijski indeks) i mrijesta riba (viši gonadosomatski indeks), a ne povećane izloženosti metalima iz okoliša (Filipović Marijić i Raspor, 2010). Stoga je vrlo važno razlučiti biološke promjene uzrokovane biotičkim čimbenicima od antropogenih utjecaja (Filipović Marijić i Raspor, 2010, 2012, 2014).

### **5.3.1 Koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve**

Poznato je kako koncentracije metala u vodi nisu odraz biološki raspoloživih koncentracija metala u tkivima akvatičnih organizama te da se mehanizam bioakumulacije metala razlikuje između organa (Vukosav i sur., 2014). Međutim, čak niti ukupna količina metala u tkivu ne može služiti za procjenu utjecaja onečišćenja vodenog okoliša jer ne odražava metabolički i trofički raspoloživu količinu metala. Naime, ukupna količina metala u tkivu sadrži i trofički “imobilizirani” dio, pohranjen u vakuolama ili slabo topljivim kompleksima, koje će organizam izlučiti pa se neće povećati raspoloživa koncentracija metala unutar stanica. Toksični učinak metala ovisi o koncentraciji specifičnih kemijskih oblika koji su biološki dostupni organizmu. Stoga je bitno odrediti citosolske metale jer upravo oni odražavaju biološki raspoloživu frakciju metala (Filipović Marijić, 2004).

Utjecaj povišenih koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi na ribe koje žive u rijeci Krki uz grad Knin jasno je vidljiv iz povišenih koncentracija većine metala u citosolu jetre pastrva iz tog dijela toka u usporedbi s izvorom rijeke Krke (Slike 14 i 15). Tehnološke i komunalne otpadne vode predstavljaju kontinuirani izvor unosa metala zbog nepostojanja adekvatnog sustava za pročišćavanje. Osim metala čije su najviše koncentracije zabilježene uz grad Knin, ističu se metali poput Cd i Cs koji su u obje sezone statistički značajno povišeni u citosolu jetre potočnih pastrva ulovljenih na izvoru rijeke Krke. Povišene koncentracije ovih metala u riba s izvora rijeke Krke vjerojatno su prirodnog podrijetla. Neobično visoke koncentracije Cd povezuju se s tlima bogatima organskom tvari i sumporom. Martinez i sur. (2002) smatraju da se Cd vezan na sulfide oslobađa oksidacijom tijekom prirodnih procesa kemijskog trošenja stijena. Takva tla koja sadrže velike količine organske tvari se ispiru i voda obogaćena Cd ponire u podzemlje te je to uzrok povišenih koncentracija Cd na izvorima rijeka. U istraživanju sedimenta

Velikog jezera otoka Mljeta, u kojem je prisutan najveći postotak karbonata, dokazano je kako riječni sediment može biti značajno mjesto akumulacije metala u tragovima. Poznato je kako Cd ima jedan od najvećih afiniteta vezanja na kalcit. Naime, u sedimentu su zabilježene povećane koncentracije Cd te autor navodi kako one mogu biti posljedica vezanja kadmija u strukturu karbonata umjesto kalcija (Jurković, 2016). Također, postoji mogućnost da su vapnenci i dolomiti, koji izgrađuju Dinarski prostor na kojem izvire rijeka Krka, obogaćeni spojevima Cd te su uzrok značajno povišenih koncentracija Cd u jetri riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke. Dosadašnja istraživanja koncentracija Cd na izvoru rijeke Krke nisu dovoljna kako bi se sa sigurnošću mogao odrediti razlog povišenih koncentracija Cd. Stoga je potrebno provesti dodatne analize mjerenja koncentracija metala u sedimentu te procijeniti unos metala putem prehrane i škrge.

### **5.3.2 Biomarkeri**

#### **5.3.2.1 Metalotioneini**

Pobudna sinteza MT biokemijski je odgovor organizma na izloženost metalima, kao što su Cd, Cu, Zn i Hg. Zbog njihove biološke reaktivnosti kao odgovor na bioakumulaciju metala, predstavljaju molekularne indikatore (biomarkere) izloženosti metalima (Roesijadi, 1994). Pobudna sinteza MT najveća je u tkivima koja se najčešće koriste za unos, pohranu i ekskreciju metala, a to su probavna žlijezda školjkaša, jetra i škrge riba (van der Oost i sur., 2003). Pastrve ulovljene kod izvora rijeke Krke imaju statistički značajno povišene koncentracije MT u odnosu na pastrve koje obitavaju u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin (Slika 16). Na izvoru rijeke Krke zabilježene su i statistički značajno više vrijednosti Cd u citosolu jetre pastrva (Slika 14). Pobudnu sintezu MT uzrokuju različiti teški metali, posebno Ag, Cd, Cu, Pb i Zn (Viarengo i sur., 2000). S obzirom na značajno povišene vrijednosti MT i Cd na istoj postaji, može se zaključiti kako porast MT prati povišene koncentracije citosolskog Cd jer je glavna uloga MT vezanje metala i detoksikacija toksičnih metala, poput Cd.

Postoji niz istraživanja koja su potvrdila pobudnu sintezu MT putem Cd, koji ima veliki ekološki značaj zbog svoje toksičnosti. Dokazano je da se u šarana (*Cyprinus carpio*) koncentracija Cd u jetri i bubrezima značajno linearno povećava porastom

koncentracija Cd kojima su ribe izlagane u laboratoriju. Do pobudne sinteze MT najprije dolazi u jetri, kao glavnom organu za detoksikaciju. Kada dođe do zasićenja jetre, kompleksi Cd-MT se transportiraju u bubrege, koji služe za pohranu Cd. Također, pokazano je da postoji kompeticija između Cd, Cu i Zn za vezna mjesta na MT, što dovodi do promjene koncentracija Cu i Zn. Kada su ribe izložene povišenoj koncentraciji Cd, ovaj ion može istisnuti Cu i Zn s veznih mjesta na MT (De Conto Cinier i sur., 1998). Dugoročno laboratorijsko izlaganje potočne zlatovčice (*Salvelinus fontinalis*, por. Salmonidae) Cd, uzrokovalo je povišene koncentracije MT u jetri (Hamilton i sur., 1987). Krasnići i sur. (2013) su na divljoj populaciji klena (*Squalius cephalus*) potvrdili da je među citosolskim proteinima za vezanje Cd upravo odgovoran MT.

Povišene koncentracije citosolskog Cd i MT u riba s izvora rijeke Krke u odnosu na dio toka uz grad Knin mogu biti posljedica prirodne izloženosti Cd zbog njegovog prisustva u riječnim naslagama vapnenca i dolomita, kao što je već navedeno u raspravi o metalima.

### **5.3.2.2 Ukupni citosolski proteini**

Narušavanjem normalne ravnoteže organizma vanjskim utjecajima dolazi do niza promjena, koje se mogu pratiti na razini populacije, tkiva ili stanice. Promjene na staničnoj razini utječu na sintezu ili funkciju proteina, zbog njihove uloge u odvijanju životnih procesa. Koncentracije proteina se određuju u staničnom citosolu, koji je osnovna supstanca koja ispunjava stanice. Na promjene koncentracija proteina mogu utjecati razni stresni čimbenici, kao što su smanjena koncentracija otopljenog kisika, promjena pH, povišena temperatura ili povišena koncentracija metala u vodi, pa se stoga citosolski proteini koriste kao biomarkeri staničnog stresa. Određivanje ukupnog sadržaja staničnih proteina predstavlja rani biopokazatelj antropogenih ili drugih utjecaja na indikatorski organizam u staništu u kojem živi.

Značajno viša koncentracija ukupnih citosolskih proteina u riba ulovljenih u jesen kod izvora rijeke Krke u usporedbi s postajom kod grada Knina može biti povezana s povišenim vrijednostima proteina MT na izvoru u tom razdoblju (Slike 16 i 17). Također, uzrok promjene koncentracija proteina mogu biti i više koncentracije Cd, Cs, Rb, Tl i U u citosolu jetre pastrva ulovljenih na izvoru rijeke Krke u usporedbi s dijelom toka uz grad

Knin. Filipović Marijić i Raspor (2010) potvrdile su pobudnu sintezu citosolskih proteina u klena (*Squalius cephalus*) iz rijeke Save u ovisnosti o citosolskim metalima. Naime, esencijalni metali (Zn, Fe, Mn, Cu) su sastavni dio proteina i imaju važnu strukturalnu, regulatornu i enzimatsku ulogu u funkciji proteina, pa njihove koncentracije ovise i o fiziologiji riba, posebno tijekom razdoblja mrijesta. S obzirom da jesensko razdoblje uzorkovanja prethodi sezoni mrijesta potočne pastrve, moguće je da su započele i fiziološke promjene u riba koje uzrokuju porast koncentracija citosolskih proteina, što potvrđuju i značajno povišene vrijednosti gonadosomatskog indeksa u riba s izvora rijeke Krke (Tablica 3). Stegeman i sur. (1992) zabilježili su porast koncentracija citosolskih proteina u ovisnosti i o različitim organskim zagađivalima. Sezonske razlike u koncentraciji citosolskih proteina u jetri potočne pastrve ukazuju kako ribe koje obitavaju kod grada Knina imaju značajno više vrijednosti citosolskih proteina u proljeće u odnosu na jesen te očito postoje značajne sezonske varijacije, vjerojatno ovisne i o fiziologiji riba, a ne samo vanjskim utjecajima.

Biološki pokazatelji izloženosti zagađivalima u potočne pastrve ne ukazuju na značajne promjene na staničnoj razini u jetri riba ulovljenih u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin. Time je potvrđeno da utjecaj otpadnih tehnoloških i komunalnih voda nije doveo do mjerljivih staničnih promjena u riba. Svakako, povišene koncentracije ukupnih citosolskih metala u riba ulovljenih uz grad Knin u odnosu na izvor rijeke Krke ukazuju na izloženost metalima i njihovu veću bioraspoloživost području točkastih izvora zagađenja te u ekotoksikološkim istraživanjima citosolski metali predstavljaju potencijalne biološke pokazatelje izloženosti vodenih organizama metalima. Prilikom primjene koncentracije citosolskih metala i proteina u ribljim tkivima kao pokazatelja kakvoće vode i izloženosti organizama metalima ne smije se zanemariti njihova ovisnost o fiziološkom stanju ribe.

## 6 ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata fizikalno-kemijske kakvoće vode, koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi te procjene utjecaja onečišćenja na pastrve praćenjem koncentracija ukupnih citosolskih metala i biomarkera zaključeno je sljedeće:

- voda na izvoru rijeke Krke je vrlo dobrog ekološkog stanja;
- fizikalno-kemijski čimbenici kakvoće vode ukazuju na pogoršanje ekološkog stanja vode u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin što u obje sezone, proljetnoj i jesenskoj, potvrđuju vrijednosti ispod dobrog ekološkog stanja za većinu od 19 izmjerenih čimbenika;
- usporedba koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi ukazuje na unos metala u rijeku Krku u dijelu toka kod tvornice vijaka, kao i uz ispuste komunalnih otpadnih voda, što potvrđuju i koncentracije metala u staničnom citosolu potočnih pastrva, uz izuzetak Cd, Cs, Rb, Tl i U što se vjerojatno može pripisati prirodnom podrijetlu, ali zahtjeva dodatna istraživanja;
- koncentracije biomarkera izloženosti metalima (metalotioneina) su značajno povišene u riba ulovljenih u proljeće kod izvora rijeke Krke i vjerojatno prate povišene koncentracije citosolskog Cd koji je jedan od glavnih metala koji dovodi do pobudne sinteze metalotioneina;
- biomarkeri općeg stresa, ukupni citosolski proteini, su značajno povišeni u jesenskom razdoblju u riba koje obitavaju kod izvora rijeke Krke, moguće zbog povišenih vrijednosti metalotioneina i pojedinih citosolskih metala, međutim postoji ovisnost i o fiziologiji riba koje se u jesenskom periodu pripremaju za mrijest;
- sezonske razlike u koncentraciji citosolskih metala i proteina su najvjerojatnije uzrokovane fiziološkim stanjem riba, a ne samo vanjskim utjecajima;
- većina čimbenika kakvoće vode ukazuje na poboljšanje ekološkog stanja na postaji 1 km nizvodno od grada Knina što može ukazivati na prirodni potencijal samopročišćavanja rijeke Krke, međutim dokazani antropogeni utjecaji potvrđuju da je neophodno provoditi sustavno praćenje kakvoće vode rijeke Krke.



## 7 LITERATURA

- Alar V. (2015): Kemijska postojanost metala. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu
- Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P. S. (2006): Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **76**: 160–202.
- Anke M. K. (2004): Essential and Toxic Effects of Macro, Trace, and Ultra trace Elements in the Nutrition of Animals. U: Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoepler M. (ur.), *Elements and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. Wiley-VCH, Weinheim, 305–341.
- Barešić J. (2009): Primjena izotopnih i geokemijskih metoda u praćenju globalnih i lokalnih promjena u ekološkom sustavu Plitvičkih jezera, disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
- Bonacci O., Perica S. (1990): Specifičnosti hidrologije sliva Krke, Ekološke monografije knjiga 2, Zbornik radova sa Simpozija: "NP Krka – stanje i problemi zaštite ekosistema, HED, 85–114.
- Bonacci O., Ljubenkov I. (2005): Nove spoznaje o hidrologiji rijeke Krke, Hrvatske vode **13**: 265–281.
- Bonacci O. (2016): Hidrološka analiza pojave mutnoće na izvorima u kršu: interpretacija podataka mjerenih na izvoru Omble. Stručni prikaz. Hrvatske vode **24**: 47–57.
- Branica M. (1990): Environmental research in aquatic systems. Scientific Series of the International Bureau, Forschungszentrum Jülich **3**: 1–15.
- Branica M. (1999): Tragovi metala u prirodnim vodama. Zbornik radova 2. Hrvatske konferencije o vodama u Dubrovniku, Hrvatske vode, Zagreb, 43–52.

- Bunn S. E i Griffith University (2002): Healthy river ecosystems: vision or reality?  
Profesional lecture presented at Griffith University, Australia
- Catsiki V. A., Strogyloudi E. (1999): Survey of metal levels in common fish species from Greek waters. *The Science of the Total Environment* **237/238**: 387–400.
- Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): Stanica - molekularni pristup, 3. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
- Cukrov N., Cmuk P., Kwokal Ž., Marguš D., Mlakar M., Omanović D. (2007): Ecotoxic trace metals in waters of “Krka” National Park – Croatia, Proceedings of Second International Conference on Waters in Protected Areas, Nakić Z. (ur.), Zagreb: Croatian Water Pollution Control Society, 226–229.
- Cukrov N. (2008): Tragovi metala u „čistim“ vodama na primjeru rijeke Krke. Voda i mi III. Spevec S. (ur.). Zagreb: Hrvatsko geološko društvo, 17–20.
- Cukrov N., Cmuk P., Mlakar M., Omanović D. (2008): Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of self-purification. *Chemosphere* **72**: 1559–1566.
- Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Tomec M., Teskeredžić E. (2000): Ribe, bioindikator i kakvoće vode. 6. stručni sastanak laboratorija ovlaštenih za ispitivanje voda : zbornik radova / Ledecki, Zlatko ; Širac, Siniša ; Raspor, Biserka (ur.). – Zagreb
- Ćorić D. (2016): Posebni metalni materijali. Materijal za predavanja, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu
- Debeljak Lj. (1982): Životni uvjeti u vodi. Slatkovodno ribarstvo, Zagreb
- De Conto Cinier C., Petit-Ramel M., Faure R., Bortolato M. (1998): Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in *Cyprinus carpio* Tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **61**: 793–799.
- Direktiva 2008/105/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o standardima kvalitete okoliša u području vodne politike i o izmjeni i kasnijem

stavljanju izvan snage Direktiva Vijeća 82/176/EEZ, 83/513/EEZ, 84/156/EEZ, 84/491/EEZ, 86/280EEZ i izmjeni Direktive 2000/60/EZ Europskog parlamenta i Vijeća

Dragun Z. (2006): Određivanje biološki raspoložive koncentracije metala u škrigama klena (*Leuciscus cephalus*) i u vodi. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

EN ISO 11905-1:1997 Water quality -- Determination of nitrogen -- Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate.

Emoyan, O.O., F.E, Ogban; and E, Akarah. 2006. Evaluation of Heavy Metals Loading of River Ijana in Ekpan-Warri, Nigeria. *J. Appl. Sc. Environ. Mgt* **10** (2): 121–127.

Erk M., Ivanković D., Raspor B., Pavičić J. (2002): Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* **57**: 1211–1218.

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 Buletin*, **36**: 509–518.

Filipović Marijić V. (2004): Metalotioneini i tragovi metala u nekim ribama jadranskog priobalnog područja Hrvatske. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Filipović Marijić V. (2009): Raspodjela odabranih esencijalnih i toksičnih metala u tkivu, citosolu i crijevnim nametnicima probavila klena (*Squalius cephalus*). Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

Filipović Marijić V., Raspor B. (2010): The impact of fish spawning on metal and protein levels in gastrointestinal cytosol of indigenous European chub. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **152**: 133–138.

- Filipović Marijić V., Raspor B. (2012): Site-Specific Gastrointestinal Metal Variability in Relation to the Gut Content and Fish Age of Indigenous European Chub from the Sava River. *Water, Air, & Soil Pollution* **223**: 4769–4783.
- Filipović Marijić V., Raspor B. (2014): Relevance of biotic parameters in the assessment of the spatial distribution of gastrointestinal metal and protein levels during spawning period of European chub (*Squalius cephalus*). *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 7596–7606.
- Gaillardet J., Viers J., Dupré B. (2004): Trace elements in river waters. U: Holland H.D., Turekian K. K. (ur.), *Treatise on geochemistry: Surface and groundwater, weathering, and soils* **3**: 225–272.
- Giller P. S., Malmqvist B. (1998): *The biology of Streams and Rivers*. Oxford University, Pres. Oxford, 296 str.
- GLOBE program (2003): Priručnik za mjerenja- istraživanje vode. Prevela i prilagodila: Renata Matoničkin Kepčija
- Goldberg E. D., Bowen V. T., Farrington, J. W., Harvey G., Martin J. H., Parker P. L., Risebrough R. W., Robertson W., Schneider E., Gamble E. (1978): The mussel watch. *Environmental Conservation* **5**: 10–125.
- Hamer B., Jakšić Ž., Pavičić-Hamer D., Perić L., Medaković D., Ivanković D., Pavičić J., Zilberberg C., Schroderd H. C., Muller W. E. G., Smodlaka N., Batel R. (2008): Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquatic Toxicology* **89**: 137–151.
- Hamilton S. J., Mehrle P. M., Jones J. R. (1987): Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society* **116**: 551–560.
- Hamza-Chaffai A., Amiard J. C., Pellerin J., Joux L., Berthet B. (2000): The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ

metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **127**: 185–197.

HRN EN 14011 (2005) Kakvoća vode – Uzorkovanje riba električnom strujom.

HRN EN ISO 8467:2001 (2001) Kakvoća vode – Određivanje permanganatnog indeksa.

Ivanković D., Pavičić J., Erk M., Filipović Marijić V., Raspor B. (2003): Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 1303–1313.

Jukić D. i ostali, (2006): Plan upravljanja rijekom Krkom. Hrvatske vode, Vodnogospodarski odjel Split za vodno područje Dalmatinskih slivova.

Jurković F. (2016): Mineraloške i geokemijske značajke tla i sedimenta na području Velikog jezera otoka Mljeta. Diplomski rad, Rudarsko-geološko-naftni fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Korfali S. I., Davies B. E., (2005): Seasonal variations of trace metal chemical forms in bed sediments of a karstic river in Lebanon: implications for self-purification. *Environ. Geochem. Health* **27**: 385–395.

Kottelat M. i Freyhof J. (2007): *Handbook of European Freshwater Fishes*. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany

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*). *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 2340–2351.

Lamková K., Šimková A., Palíková M., Jurajda P., Lojek A. (2007): Seasonal changes of immunocompetence and parasitism in chub (*Leuciscus cephalus*), a freshwater cyprinid fish. *Parasitology Research* **101**: 775–789.

- Lecoeur S., Videmann B., Berny P. H. (2004): Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* **94**: 184–191.
- Li S., Zhang Q. (2010): Risk assessment and seasonal variations of dissolved trace elements and heavy metals in the Upper Han River, China. *Journal of Hazardous Materials* **181**: 1051–1058.
- Livingstone D. R. (1993): Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **53**: 195–211.
- Lončar N., 2002: Vode u kršu najosjetljivije na zagađenje. *Okoliš* 112/113, Zagreb, 37-38.
- Lositskii N. T., Grigor'ev A. A., Khitrova G. V. (1966): Welding of chemical equipment made from two-layer sheet with titanium protective layer. *Chemical and Petroleum Engineering* **2**: 854–856.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–275.
- Maitland P. S., Linsell K. (2009): *The Hamlyn Guide to Freshwater Fish of Britain and Europe*. Bounty Books, London, 191–199.
- Marie V., Baudrimont M., Boudou A. (2006): Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two fresh water bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* **65**: 609–617.
- Martinez, C. E., McBride, M. B., Kandianis, M. T.; Duxbury, J. M., Yoon, S., Bleam, W. F. (2002): Zinc sulfur and cadmium-sulfur association in metalliferous peats: evidence from spectroscopy, distribution coefficients, and phytoavailability. *Environmental Science & Technology* **36**: 3683–3689.

- Mihevc A., Prelovšek M., Zupan Hajna N. (2010): Introduction to the Dinaric karst. Karst Research Institute at Research Centre of the Slovenian Academy of Sciences and Arts, Postojna, Slovenia, 71 str.
- Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P. i Zanella D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture i Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
- Nakić Z., (2000): Analiza rezultata istraživanja stanja postojećeg sustava zaštite podzemnih voda crpilišta u Hrvatskoj. Hrvatske Vode **8**: 1–16.
- Obiakor M. O., Okonkwo J. C., Ezeonyejiaku C. D., Ezenwelu C. O. (2013): Physicochemical and heavy metal distribution in freshwater column: season-location interaction effects and public health risk. Journal of Biomedical Science **3**: 308–317.
- Omanović D., Cukrov N., Kwokal Ž. (2005): Tragovi metala u vodi rijeke Krke. U: Marguš D. (ur.), Knjiga sažetaka. JU "Nacionalni Park Krka", Šibenik, 49.
- Omanović D., Kwokal Ž., Cukrov N., Cmuk P., Mlakar M., Pižeta I., Pavlus N., Špoljarić I., Stojanovska M. (2007): Spatial Distribution of Ecotoxic Trace Metals in Waters of "Plitvička Jezera" National Park - Croatia, Proceedings of Second International Conference on Waters in Protected Areas, Nakić Z. (ur.), Zagreb: Croatian Water Pollution Control Society 217–221.
- Pawar S. B., Shembekar V. S (2012): Studies on the physico-chemical parameters of reservoir at Dhanegoan district Osmanabad (M.S.), India.
- Perica D., Orešić D., Trajbar S. (2007): Geomorfološka obilježja doline i porječja rijeke Krke s osvrtom na dio od Knina do Bilušića buka. Marguš D. (ur.), Zbornik radova sa simpozija Rijeka Krka i Nacionalni park Krka, Šibenik
- Phillips D. J. H., Rainbow P. S. (1993): Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Chapman & Hall, London.

- Piria M. (2007): Ekološki i biološki čimbenici ishrane ciprinidnih vrsta riba iz rijeke Save. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Plan upravljanja Nacionalnim parkom "Krka" (2011), Šibenik
- Polšak A., Korolija B., Fritz F., Božičević S. (1990): Geološka i hidrogeološka obilježja Nacionalnog parka Krka, Ekološke monografije 2, Hrvatsko ekološko društvo, Zagreb, 15–30.
- Poljak M. (2012): Procjena ekološkog stanja jezera Brljan i Visovac na temelju zajednice makrozoobentosa. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Raspor B. (2004): Elements and elemental compounds in waters and the aquatic food chain. U: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M (ur.), Elements and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance. Wiley-VCH, Weinheim, 127–146.
- Raspor B., Dragun Z., Erk M. (2005): Examining the suitability of mussel digestive gland to serve as a biomonitoring target organ. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju **56**: 139–147.
- Riley J. P., Chester R. (1971): Introduction to Marine Chemistry, Academic Press, London and NY.
- Robbins A. H., Stout C. D. (1992): Crystal structure of metallothionein. U: Stillman M.J., Shaw III, C.F., Suzuki K.T. (ur.), Metallothioneins: synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes, VCH Publishers Inc., NY, 31–54.
- Roesijadi G. (1994): Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. Environmental Health Perspectives **102**: 91–95.
- Sadiq M. (1992): Toxic Metal Chemistry in Marine Environments. Marcel Dekker, Inc., NY.



- Scoullou M., Alamei A., Boulouxi A., Malotidi V., Vazeou S. (2005): Voda u Mediteranu, Obrazovni paket, MIO-ECSDE i GWP-MED, Mediteranski obrazovni ured za okoliš, kulturu i održivi razvoj, Atena.
- Sheehan D., Power, A. (1999): Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **123**: 193–199.
- Sofilić T. (2015): Zdravlje i okoliš. Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 22<sup>nd</sup> edition. (2012): APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation)
- Staniskiene B., Matusevicius P., Budreckiene R., Skibniewska K. A. (2006): Distribution of Heavy Metals in Tissues of Freshwater Fish in Lithuania. *Polish Journal of Environmental Studies* **15**: 585–591.
- Stegeman J. J., Brouwer M., Richard T. D. G., Förlin L., Fowler B. A., Sanders B. M., van Veld P. A. (1992): Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett R. J., Kimerly R. A., Mehrle P. M. Jr., Bergman H.L. (ur.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 235–335.
- Šverko V. (1997): *Biologija – Od molekule do organizma*. Profil, Zagreb
- Tesseier A., Turner D. R. (1995): Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems* **3**: 45–103.
- Tolić S. (2013): *Analiza vode i tla - Projekt IPAQ, 5. gimnazija*. Zavod za javno zdravstvo Andrija Štampar
- Tušar B. (2004): *Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode*, Croatiaknjiga, Zagreb

Uredba o standardu kakvoće voda (NN 73/2013). Vlada Republike Hrvatske

van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57–149.

Vašak M., Galdes A., Hill H. A. O., Kägi J. H. R., Bremmer I., Young B. W. (1980): Investigation of the structure of metallothionein by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **19**: 416–425.

Viarengo A., Nott J. A. (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **104(3)**: 355–372.

Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. (1997): A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research* **44**: 69–84.

Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I. (2000): Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* **46**: 407–417.

Vukosav P., Mlakar M., Cukrov N., Kwokal Z., Pižeta I., Pavlus N., Špoljarić I., Vurnek M., Brozinčević A., Omanović D. (2014): Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park (Croatia). *Environmental Science and Pollution Research International* **21**: 3826–39.

Ziegler A. C. (2002): Issues related to use of turbidity measurements as a surrogate for suspended sediment. *Turbidity and Other Sediment Surrogates Workshop*, April 30 – May 2, 2002, Reno, Nevada

Žugaj R., Marković V., (1990): Karakteristike vodnog režima rijeke Krke. 127–138. U: Kerovec, M. (ur.). *Zbornik radova sa simpozija „NP Krka – stanje istraženosti i problemi zaštite“*. Ekološke monografije. Hrvatsko ekološko društvo, **2**:1–604.

Wood C. M., Farrell A. P., Brauner C. J. (2012a): Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Fish Physiology A, volumen 31. London: Academic Press.

Wood C. M., Farrell A. P., Brauner C. J. (2012b): Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Fish Physiology B, volumen 31. London: Academic Press.

### **Internetski izvori**

URL 1: Zemljopisni položaj, Rijeka Krka, (<http://www.nprka.hr/stranice/zemljopisni-položaj/86.html>, pristupljeno 22.08.2017.)

URL 2: Dioničko društvo Varkom,  
(<http://www.varkom.hr/default.asp?SubItemID=14085&FlashID=14014&ParentID=13713&title=tvrdocce>, pristupljeno 23.08.2017.)

URL 3: Vijčana roba i ostali pribor, DIV d.o.o.,  
(<http://www.div.com.hr/div.asp?show=products&id=1>, pristupljeno 30.08.2017.)

## 8 ŽIVOTOPIS

### Zuzana Redžović

Rođena sam 24. rujna 1993. godine u gradu Pieštany u Slovačkoj. Prve dvije godine života provela sam u Slovačkoj, a zatim sam se s roditeljima preselila u Hrvatsku. U Puli sam završila OŠ Monte Zaro te sam upisala Gimnaziju Pula. Daljnje školovanje nastavila sam u Zagrebu, gdje sam 2012. godine upisala preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija upisala sam 2015. godine. Tijekom studija sam sudjelovala u znanstveno-popularizacijskim događajima poput Smotre sveučilišta, Znanstvenog piknika, Znanstvenog kvarta u okviru programa „Plac znanja“ na Interliberu, Noći biologije, Otvorenog dana Instituta Ruđer Bošković „Potraga za jezgrom“ i volontirala u Botaničkom vrtu u Zagrebu. Aktivan sam član Sekcije za skakavce i zrikavce i Sekcije za ptice u okviru Udruge studenata biologije (BIUS) te sam bila na istraživačko-edukacijskim projektima na Cresu, Papuku i Dugom otoku. Sudjelovala sam i u organizaciji Drugog i Trećeg simpozija studenata bioloških usmjerenja. U Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u okviru projekta „Procjena kakvoće vodotoka rijeke Krke i potencijalne opasnosti za Nacionalni park Krka primjenom novih bioindikatora i biomarkera“, koji je financirala Zaklada Adris, provela sam istraživanje pod vodstvom dr. sc. Vlatke Filipović Marijić, koje je nagrađeno Rektorovom nagradom u akademskoj godini 2016./2017. S rezultatima ovog istraživanja sudjelovala sam na „6<sup>th</sup> ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry“, „2. Simpoziju o biologiji slatkih voda“ te „Trećem simpoziju studenata bioloških usmjerenja“.