

Razine molekularnih biomarkera i akumulacija metala u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta exulcerata* Porro, 1838 iz Visovačkog jezera

Dragičević, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:532115>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Paula Dragičević

**Razine molekularnih biomarkera i akumulacija metala u
probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta exulcerata* Porro, 1838 iz
Visovačkog jezera**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dušice Ivanković uz suvoditelja izv. prof. dr. sc. Jasnu Lajtner sa Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Najiskrenije se zahvaljujem voditeljici rada i mentorici dr. sc. Dušici Ivanković na uloženom trudu, vremenu, podršci i pomoći u nastanku ovog rada. Hvala na ukazanom povjerenju, bezgraničnom strpljenju, savjetima i ugodnom društvu.

Veliko hvala suvoditeljici rada izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner na pomoći pri pronalaženju željene teme diplomskog rada, vrijednim savjetima, trudu, pristupačnosti i spremnosti na pomoć.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu na srdačnosti i gostoprimstvu.

Iskreno se zahvaljujem Nesreti Krasnici, dipl. inž. iz Laboratorija za biološke učinke metala Instituta „Ruđer Bošković“ na pruženoj pomoći u pripremi uzoraka za analizu.

Osobito se zahvaljujem dr. sc. Zrinki Dragun iz Laboratorija za biološke učinke metala Instituta „Ruđer Bošković“ na susretljivosti i nesebičnoj pomoći oko mjerenja metala na HR ICP-MS-u.

Hvala djelatnicima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta „Ruđer Bošković“ što su mi omogućili da radim u njihovom laboratoriju.

Veliko hvala mojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene za vrijeme studija, a posebno Ivi, Barbari, Marini, Dori, Juranu i Krisu, s kojima je studiranje bilo zabavnije i lakše, a tereni se pretvorili u nezaboravno iskustvo.

Puno hvala mojoj kumi Dori na podršci i iskusnim savjetima tijekom studiranja.

Hvala Ivanu što je vjerovao u mene svaki put kad ja nisam.

Hvala mom bratu Ninu koji me, svaki put kad bih se izgubila u studentskim obavezama, ponovno podsjetio na ljepote biologije.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji na bezgraničnoj podršci i vjerovanju u mene tijekom cijelog obrazovanja.

Za Mamu i Tatu, koji se mojoj diplomi vesele više nego ja

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Razine molekularnih biomarkera i akumulacija metala u probavnoj žlijezdi školjkaša
Anodonta exulcerata Porro, 1838 iz Visovačkog jezera

Paula Dragičević
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U krškim područjima Hrvatske prirodne koncentracije metala su uglavnom niske, zbog čega su vodeni sustavi tih područja vrlo osjetljivi na povišene koncentracije metala. Visovačko jezero dio je ekosustava u zaštićenom dijelu rijeke Krke. Dosadašnja istraživanja ukazala su na povišenje razine nekih ekotoksičnih metala u sedimentima ovog jezera kao posljedicu antropogenog djelovanja, no za bolju procjenu rizika onečišćenja metalima potrebno je istražiti njihov utjecaj na organizme. Školjkaš *Anodonta exulcerata* korišten je kao bioindikator u ovom radu. Analiziran je sadržaj metala u jezerskoj vodi i u probavnoj žlijezdi školjkaša s plićeg i dubljeg lokaliteta. Određeni su molekularni biomarkeri izloženosti i učinaka zagađivala: metalotioneini, ukupni glutation, ukupni proteini i malondialdehid. Analiza uzoraka jezerske vode ukazala je na relativno niske razine otopljenih metala u vodi Visovačkog jezera. Uočene su značajne razlike u bioraspoloživosti pojedinih metala u plićem i dubljem dijelu Visovačkog jezera. Analiza raspodjele metala između topljive i netopljive frakcije tkiva probavne žlijezde ukazala je na specifične obrasce raspodjeljivanja pojedinih elemenata između ovih dviju frakcija pri povećanoj akumulaciji. Koncentracije metalotioneina ukazale su na značajno veću izloženost školjkaša s dubljeg lokaliteta. Koncentracija glutationa bila je značajno povišena u školjkaša s plićeg lokaliteta.

(76 stranica, 21 slika, 11 tablica, 74 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: bioindikator, onečišćenje, metalotioneini, glutation, malondialdehid, oksidativni stres

Voditelj: dr. sc. Dušica Ivanković, viši znanstveni suradnik, Institut "Ruđer Bošković"

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

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

doc. dr. sc. Renata Šoštarić

doc. dr. sc. Inga Marijanović

Rad prihvaćen: 01.02.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Molecular biomarker levels and metal accumulation in the digestive gland of bivalve
Anodonta exulcerata Porro, 1838 from Visovac Lake

Paula Dragičević
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In the karst areas of Croatia natural concentrations of metals are generally low, which is why water systems in these areas are very sensitive to elevated metal concentrations. Visovac Lake is a part of the ecosystem in the protected part of the Krka River. Previous research has shown an increase in some ecotoxic metals' levels in sediments of this lake as a result of anthropogenic activity but in order to better assess the risk of metal contamination, it is necessary to estimate their influence on the organisms. Bivalve *Anodonta exulcerata* was used as a bioindicator in this paper. The content of metal was analyzed in the lake water and in the digestive gland of the bivalves from the shallower and deeper site. Molecular biomarkers of exposure and effect were measured: metallothionein, total glutathione, total protein and malondialdehyde. Analysis of lake water samples showed relatively low levels of dissolved metals in Visovac Lake water. Significant differences in the bioavailability of certain metals were observed in the shallower and deeper parts of the Lake Visovac. The analysis of the distribution of metal between the soluble and insoluble fraction of digestive gland showed specific patterns of distribution of some elements between these two fractions at increased accumulation. Concentrations of metallothionein showed a significantly greater exposure of bivalves from a deeper locality. The glutathione concentration was significantly elevated in bivalves from the shallower site.

(76 pages, 21 figures, 11 tables, 74 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Keywords: bioindicator, pollution, metallothioneins, glutathione, malondialdehyde, oxidative stress

Supervisor: Dr. Dušica Ivanković, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Co-supervisor: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Renata Šoštarić, Asst. Prof.

Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Thesis accepted: 01.02.2018.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Metali u vodenim ekosustavima	1
1.2. Procjena onečišćenja voda metalima	3
1.3. Školjkaši kao bioindikatorski organizmi	5
1.4. Biomarkeri izloženosti i toksičnih učinaka metala	8
1.4.1. Metalotioneini (MT)	9
1.4.2. Glutation (GSH)	11
1.4.3. Malondialdehid (MDA)	12
1.5. Ciljevi rada	13
2. MATERIJALI I METODE	14
2.1. Područje istraživanja	14
2.2. Uzorkovanje	16
2.2.1. Uzorkovanje školjkaša	16
2.2.2. Uzorkovanje vode	17
2.3. Indikatorski organizam	17
2.4. Obrada tkiva probavne žlijezde u svrhu određivanja koncentracija ukupnih metala, citosolnih metala, citosolnih proteina i metalotioneina	19
2.5. Razgradnja homogenata i citosola	21
2.6. Određivanje koncentracije metala i metaloida	21
2.7. Određivanje koncentracije staničnih biomarkera	24
2.7.1. Kvantitativno određivanje metalotioneina	24
2.7.1.1. Etanolna precipitacija	24
2.7.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa (DTNB)	26
2.7.2. Kvantitativno određivanje ukupnog glutaciona (tGSH)	27
2.7.3. Kvantitativno određivanje malondialdehida (MDA)	28
2.7.4. Kvantitativno određivanje ukupnog sadržaja proteina u citosolu	30
2.8. Prikaz i obrada rezultata	31
3. REZULTATI	32
3.1. Koncentracije otopljenih metala i metaloida u vodi	32
3.2. Školjkaši	33
3.2.1. Morfološki pokazatelji i indeksi	33

3.2.2. Ukupne koncentracije metala i metaloida u probavnoj žlijezdi školjkaša <i>A. exulcerata</i>	34
3.2.2.1. Ukupne koncentracije esencijalnih elemenata u tragovima	34
3.2.2.2. Ukupne koncentracije neesencijalnih elemenata u tragovima	35
3.2.2.3. Ukupne koncentracije makroelemenata	38
3.2.3. Citosolne koncentracije metala i metaloida u probavnoj žlijezdi školjkaša <i>A. exulcerata</i>	39
3.2.3.1. Citosolne koncentracije esencijalnih elemenata u tragovima.....	39
3.2.3.2. Citosolne koncentracije neesencijalnih elemenata u tragovima.....	42
3.2.3.3. Citosolne koncentracije makroelemenata.....	49
3.2.4. Biomarkeri	52
3.2.4.1. Koncentracija proteina	52
3.2.4.2. Koncentracija metalotioneina.....	53
3.2.4.3. Koncentracija ukupnog glutationa	55
3.2.4.4. Koncentracija malondialdehida.....	55
4. RASPRAVA.....	57
4.1. Bioraspoloživost metala na različitim dubinama jezera	57
4.1.1. Voda.....	57
4.1.2. Školjkaši.....	59
4.2. Stanični biomarkeri i metali	62
4.2.1. Metalotioneini	62
4.2.2. Glutacion	63
4.2.3. Malondialdehid	63
4.2.4. Povezanost metala s biomarkerima.....	64
4.3. Unutarstanična raspodjela metala i metaloida	65
5. ZAKLJUČCI.....	67
6. LITERATURA.....	69
Životopis.....	77

Popis oznaka i kratica:

AChE	engl. <i>acetylcholinesterase</i> , acetilkolinesteraza
BHT	butilirani hidroksitoluen
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> , albumin goveđeg seruma
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> reagens
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
GR	glutation-reduktaza
GSH	reducirani glutation
GSSG	oksidirani glutation, glutation disulfid
HR ICP-MS	engl. <i>High Resolution Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> , maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom
KPE	kalij-fosfatni pufer - EDTA
LEU	leupeptin
LOD	engl. <i>limit of detection</i> , granica detekcije
MDA	malondialdehid
MT	metalotionein
NADPH	reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktivni kisikovi radikali
SSA	5-sulfosalicilna kiselina
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trikloroctena kiselina
TEP	1,1,3,3-tetraetoksiopropan

1. UVOD

1.1. Metali u vodenim ekosustavima

Slatkovodni ekosustavi čine 0,01 % svjetskih voda i pokrivaju 0,8 % površine Zemlje. Bez obzira na tako mali udio, vrlo su raznoliki te ih nastanjuje oko 100 000 vrsta. Osim biološkog značaja, za ljude imaju ekonomsku, kulturnu i estetsku vrijednost (Dudgeon i sur., 2006). Ljudska aktivnost tijekom posljednjih desetljeća znatno doprinosi onečišćenju vodenih ekosustava. Izvori onečišćenja mogu se, prema načinu unošenja zagađivala u vodene sustave, podijeliti na točkaste i raspršene. Točkasti izvori su otpadne vode iz agrikalnih, industrijskih i gradskih zona koje se prikupljaju kanalizacijskim sustavom te se u prirodne vode ispuštaju kanalskim ispustima na jasno definiranim mjestima. Raspršene izvore čine vode koje se procjeđuju ili otječu s različitih prirodnih površina noseći onečišćenje do najbližih površinskih i/ili podzemnih voda. Raspršeno onečišćenje javlja se pri ispiranju urbanih površina (prometnice, parkirališta) te ispiranjem i procjednim vodama s odlagališta otpada, industrijskih dvorišta, gradilišta i poljoprivrednih površina. U vodene ekosustave dolaze i metali nastali procesima erozije tla i stijena, vulkanskim erupcijama i ljudskom aktivnošću (rudarstvom i korištenjem tvari koje sadrže metale) (Gupta i Singh, 2011).

Metali su u vodenim ekosustavima prirodno prisutni, budući da utječu na mnoge biokemijske procese i fiziološke funkcije u organizmima (a samim time i na bioraznolikost samog vodenog ekosustava), no u povećanim koncentracijama mogu imati toksični učinak. Metali, za razliku od organskih zagađivala, ne mogu nestati procesom biorazgradnje, već se raspodijele u stupcu vode, akumuliraju u sedimentu ili u živim organizmima (Cukrov i sur., 2011). U uvjetima povišene koncentracije metala, uvijek se javlja određena razina bioakumulacije, tj. dolazi do unosa zagađivala iz okolnog medija ili hrane i njihove pohrane u tkivo. Bioakumulacija koju vrše organizmi na nižim trofičkim razinama vodi do nakupljanja zagađivala u organizmima na višim trofičkim razinama (proces biomagnifikacije). Ta pojava može imati toksični učinak na više organizme, kao i na ljude koji se njima hrane (Ware, 1991). Bioakumulacija se događa kad brzina unosa zagađivala u organizam premaši brzinu njegove eliminacije (Naimo, 1995).

U posljednjih nekoliko desetljeća primijećena je povišena koncentracija metala u vodenim ekosustavima. Povišene koncentracije metala nisu izmjerene samo u zagađenim vodama, već u svim geografskim područjima, što ukazuje na to da metali u ekosustave ulaze iz raznoraznih izvora te se među njima prenose atmosferskim, kopnenim, podzemnim, vodenim i biološkim

putevima (Ware, 1991). Zbog antropogenog djelovanja gotovo sve vode sjeverne polutke sadrže metale kao što su živa, kadmij i olovo (Naimo, 1995).

Teški metali jedni su od najčešćih zagađivala u vodenom okolišu, a njihova prisutnost u sedimentu ovisi o veličini čestica, sastavu sedimenta i drugih organskih tvari. Mogu biti adsorbirani na sediment ili akumulirani u bentičkim organizmima. U različitim oblicima mogu imati drugačije razine toksičnosti i bioraspoloživosti, stoga je osim koncentracije metala u vodi vrlo važno znati i u kojem je kemijskom obliku on prisutan u vodi. Mnoga istraživanja pokazala su da su koncentracije teških metala u sedimentu mnogo puta veće nego u stupcu vode, zbog čega je sediment odličan indikator zagađenja (Gupta i Singh, 2011).

Povišene koncentracije nekih metala u tragovima mogu imati toksični učinak na vrste koje žive u onečišćenom vodenom ekosustavu, posebno ako se radi o osjetljivim vrstama, što može dovesti do smanjenja ili nestajanja njihovih populacija. Posljedično dolazi do promjena u sastavu vrsta, raznolikosti vrsta i trofičkim odnosima u tom ekosustavu (Ware, 1991). Pri mjerenju koncentracija metala u tragovima u vodenim ekosustavima najbitnije je procijeniti njihovu bioraspoloživost, ali koncentracije ukupnih metala također daju dobru sliku stanja vode. Iako sedimenti djeluju kao spremišta metala u tragovima, biogeokemijskim procesima ti se metali mogu naći u stupcu vode, čime se povećava njihova koncentracija i postaju potencijalno toksični za žive organizme (Cukrov i sur., 2008).

Metali u tragovima u vodu dolaze iz prirodnih i antropogenih izvora, a njihovo se porijeklo može odrediti istraživanjem prostorne i vremenske raspodjele koncentracija metala u tragovima. Prirodno prisutne koncentracije metala u tragovima za mnoge vodene ekosustave nisu poznate. U krškim područjima Hrvatske, prirodne koncentracije metala u tragovima su uglavnom izuzetno niske, zbog čega su vodeni sustavi tih područja vrlo osjetljivi na povišene koncentracije metala u tragovima (Cukrov i sur., 2008). Koncentracija prirodno prisutnih metala u vodenim ekosustavima regulirana je prirodnim procesima i u velikoj mjeri ovisi o području, odnosno o sastavu stijena i tla (Cukrov i sur., 2011).

Osim rijeka, negativnim ljudskim utjecajem pogođena su i jezera. Jezera čine jedne od najznačajnijih slatkovodnih ekosustava. Zbog svojih karakteristika vrlo su važan dio okoliša, a imaju i gospodarsku važnost. Stanje jezera određuje količinu i sastav organizama koji ga nastanjuju, kao i kvalitetu vode (Kowalczevska-Madura i Gołdyn, 2006). Zbog mogućnosti pohrane velikih volumena vode, jezera mogu ublažiti učinke poplava i suša te utjecati na

klimu okoline. Neke rijeke i jezera koriste se kao izvori vode za piće i pri uzgoju hrane u poljoprivredi, zbog čega njihova zagađenost predstavlja prijetnju ljudskom zdravlju (Zhou i sur., 2008).

Utjecaju onečišćenja podložne su vrste i bentala i pelagijala, direktnim unosom metala u organizam ili procesom biomagnifikacije. Mnoga zagađivala imaju toksični učinak na vodene organizme te u većini slučajeva uzrokuju njihovo propadanje ili kronične bolesti, ali kod teškog zagađenja uzrokuju masivne pomore organizama. Toksični učinak ovisi o vrsti zagađivala i njegovoj koncentraciji (Gupta i Singh, 2011). Odgovor organizama na promjene u izloženosti metalima ovisi o bioraspoloživosti metala. Na bioraspoloživost metala utječu mnogi okolišni čimbenici, ali i vrsta, ponašanje, fizičke osobine i prehrana organizma (Ware, 1991).

1.2. Procjena onečišćenja voda metalima

Zabrinutost zbog povišene koncentracije metala u ekosustavima potaknula je brojna istraživanja o kemijskim svojstvima i biološkim učincima zagađivala. Dugotrajno zadržavanje metala u hranidbenom lancu i njihov toksični učinak potencijalno mogu utjecati na ljudsko zdravlje pa je zbog toga potrebna stalna kontrola razine metala u vodama (Gupta i Singh, 2011). U procjeni stanja vodenih ekosustava potrebno je kombinirati biološke, kemijske i hidrološke podatke (Ware, 1991). Proces prikupljanja podataka na određenim lokacijama u pravilnim vremenskim razmacima, s ciljem definiranja trenutnog stanja ili tendencije ka nekom stanju, naziva se monitoring (Chapman, 1996). Procjena stanja vode i njezinog onečišćenja metalima temelji se na određivanju koncentracije metala u vodi, sedimentu ili živim organizmima (Ivanković, 2006).

Kemijski monitoring je znanstvena metoda kojom se određuje razina metala u vodi i/ili sedimentu u svrhu uspoređivanja s maksimalnim dopuštenim koncentracijama. Prednost kemijskog monitoringa je jednostavnost uzorkovanja i analize uzoraka. Dobiveni rezultat je stvarni broj koji izravno ukazuje na kvalitetu vode, prema kojemu se voda može svrstati u određenu kategoriju zagađenosti. Mane kemijskog monitoringa vode su niske koncentracije i to što određivanje koncentracije metala u vodi odražava stanje samo u trenutku uzorkovanja. Za razliku od vode, sediment je bolji pokazatelj dugoročnog onečišćenja, koncentracija metala u sedimentu je veća od one u vodi, ali metali nisu uvijek bioraspoloživi za organizme zbog fizikalno-kemijskih oblika u kojima su prisutni u sedimentu (Hamza-Chaffai, 2014).

Kemijske analize okoliša, tj. sedimenta ili vode, najizravniji su pristup otkrivanju prisutnosti zagađenja teškim metalima u okolišu. Međutim, takve analize ne mogu dokazati postojanje utjecaja teških metala na organizme u zagađenom okolišu. Za razliku od kemijskog monitoringa, biološki monitoring je metoda kojom je moguće utvrditi utjecaj zagađivala na organizme (Zhou i sur., 2008).

Biološki monitoring je znanstvena metoda kojom se procjenjuje stanje okoliša i njegova izloženost prirodnim i umjetnim kemikalijama, koristeći tehniku uzorkovanja tkiva i tjelesnih tekućina nekog organizma (bioindikatora). Biomonitoring pruža informaciju o količini apsorbirane tvari u organizmu i o njezinim štetnim učincima (Gupta i Singh, 2011). U odnosu na kemijski monitoring, biomonitoring ima mnoge prednosti: otkriva promjene nastale na organizmima zbog utjecaja zagađivala; ukazuje na integrirani učinak složenijih zagađivala na organizme; visoko je osjetljiva metoda (zbog brzog odgovora organizama na zagađenje); može detektirati niske razine zagađivala (koji su kemijskim metodama bili ispod granice detekcije) zbog pojave kroničnog trovanja u organizmima tijekom dugotrajne izloženosti zagađivalu; uzorkovanje se može obaviti na udaljenim područjima; ne treba skupu opremu i stalno uzorkovanje (Zhou i sur., 2008). Problemi u biomonitoringu javljaju se kod visoke varijabilnosti rezultata, zbog koje se ponekad ne može izvesti zaključak o stanju vode ili tendenciji ka nekom stanju. Ponekad nije moguće otkriti neka zagađivala ni izvor zagađenja. Nadalje, organizmi imaju složene odnose sa svojim staništem, što otežava donošenje zaključaka na temelju samog biomonitoringa. Analiza uzoraka je u nekim slučajevima dugotrajna i skupa (Dressing, 2007).

U biomonitoringu postoje različite metode koje se primjenjuju ovisno o potrebama istraživanja. Metoda korištena u ovom radu je analiza biomarkera, koja se temelji na činjenici da kemijske tvari ulaze u organizam i u njemu imaju određeno djelovanje, koje je moguće zamijetiti zahvaljujući nastalim markerima. To mogu biti same kemijske tvari, produkti njihovog raspada ili produkti nastali kao odgovor organizma na kemijsku tvar. Njihova koncentracija ukazuje na količinu kemijskih tvari koje su ušle u organizam te na njihov učinak. Odgovor biomarkera na zagađenje može dati uvid u mehanizme zagađivala. Izbor biomarkera radi se na temelju ciljnih zagađivala, istraživanih organizama ili područja. Određeni proteini mogu biti pročišćeni kako bi se koristili kao biomarkeri (Zhou i sur., 2008).

1.3. Školjkaši kao bioindikatorski organizmi

Bioindikator je organizam koji pokazivanjem određenih simptoma ukazuje na prisutnost neke tvari u svojoj blizini. Dobar bioindikator vrlo brzo reagira na neželjene promjene u okolišu (Gupta i Singh, 2011). Svaki bioindikator ima prednosti i mane te se koriste ovisno o potrebama i ciljevima pojedinog istraživanja. Odabir adekvatnog bioindikatora je od velike važnosti u biomonitoringu (Zhou i sur., 2008). Kao bioindikator mogu se koristiti autohtoni ili alohtoni organizmi. Vrijeme izlaganja bioindikatora zagađivalu može biti kratkotrajno ili dugotrajno, ovisno o tome istražuju li se akutni ili kronični učinci zagađivala (Ware, 1991).

Koncentracije metala u tkivu mogu biti odraz zagađenja vode, a bentički organizmi zbog akumulacije metala predstavljaju osjetljive indikatore antropogenog zagađenja metalima (Gupta i Singh, 2011). Nekoliko je puteva unosa metala iz vode u organizam: preko vanjske površine organizma, respiratornih organa i probavnog epitela (iz vode i hrane). Moguć je unos metala i kombinacijom tih puteva. Da bi metal bio unesen u organizam, mora biti u hidratiziranom ionskom obliku, tj. biološki raspoloživ (Ivanković, 2006).

Mekušci se često koriste u praćenju kvalitete vode (rijeka i jezera) i u biomonitoringu metala u tragovima u vodenim ekosustavima (Katsallah i sur., 2013). Žive u gotovo svim tipovima slatkovodnih staništa, osim u ekstremno hladnim planinskim jezerima i potocima, kiselim vodama (pH ispod 6), vrlo zagađenim vodama i anoksičnim uvjetima. Nalaze se i u hladnim predjelima koji imaju povremene tople periode, gdje preživljavaju ukopavanjem u mulj ili organsku tvar te hiberniraju. Preferiraju alkalne vode zbog svoje potrebe za kalcijevim karbonatom i otopljenim solima, koje ugrađuju u školjku (Ware, 1991).

Zbog svog sjedilačkog načina života, školjkaši su jedna od skupina najosjetljivijih na zagađenje u vodenim sustavima. Iz tog razloga se koriste u procjeni stanja okoliša kod izloženosti raznim zagađivalima. Njihov odgovor na stres u okolišu očituje se kao oksidativni stres, tj. neravnoteža u obrambenom sustavu organizma i popravljaju oštećenja, te povećanje stope anaerobne glikolize (Falfushynska i sur., 2010).

Školjkaši mogu, filtrirajući veliki volumen vode, apsorbirati čestice i tako akumulirati metale u organizmu (Naimo, 1995). Metali smanjuju kvalitetu života školjkaša i utječu na njihovu funkciju u ekosustavu, što ima negativan učinak na ravnotežu u ekosustavu jer smanjuje raznolikost organizama. Nisu svi metali u organizmu raspodijeljeni jednoliko. Različiti su

metali akumulirani u različite dijelove organizma, tj. u različita tkiva i organe školjkaša (Katsallah i sur., 2013). Ciljni organ školjkaša u akumulaciji metala je probavna žlijezda, tj. lizosomi probavne žlijezde, koji se smatraju ciljnim organelima. Znatna količina teških metala taloži se i u škragama (Gupta i Singh, 2011). Općenito, koncentracija metala u slatkovodnim školjkašima najveća je u škragama i plaštu, dok se u ostalim organima akumuliraju specifični metali (npr. koncentracija kadmija najveća je u probavnoj žlijezdi, škragama i metanefridijima, a najmanja u školjki i mišiću). Mogući uzrok takve akumulacije metala unutar određenog tkiva je postojanje specifičnih vezivnih mjesta ili detoksikacijskih mehanizama u tkivu. Vrlo je malo poznato o distribuciji metala na staničnoj razini u školjkaša (Naimo, 1995). Također, na raspodjelu teških metala u mekušcima znatno utječu kemijske osobine metala i njihova interakcija s drugim zagađivalima te mnogi okolišni faktori, kao što su doba godine, strujanje vode, obnavljanje vode, veličina čestica sedimenta, organski ugljik, otopljeni kisik, pH, tvrdoća vode, salinitet te hidrološke karakteristike sustava (Gupta i Singh, 2011). Mjesto akumulacije metala je i školjka školjkaša. Međutim, na izgradnju i karakteristike školjke mogu utjecati vanjski faktori koji nemaju veze sa zagađenjem, kao što je vrtloženje vode. Stoga analizi školjke treba pristupiti s oprezom (Ware, 1991).

Određene karakteristike slatkovodnih školjkaša čine ih dobrim bioindikatorima. Uglavnom su sjedilački organizmi te zbog svoje tjelesne veličine sadrže dovoljnu količinu tkiva potrebnu za kemijske analize. S obzirom na veličinu, jedino su ribe pogodniji bioindikatorski organizmi za uzorkovanje tkiva, no njihova pokretljivost je nepoželjno svojstvo u odabiru bioindikatora. Većina školjkaša pokazuje toleranciju na izloženost metalima i mogućnost akumulacije određene količine bez letalnog ishoda. Nadalje, relativno ih je lako uzorkovati i determinirati te nisu pretjerano osjetljivi na rukovanje i obradu u laboratoriju. Zbog svog filtratorskog načina prehrane, dobri su bioakumulatori planktona, sestona i otopljenih tvari u vodi (Ware, 1991). Tako su izloženi i otopljenim zagađivalima, kao i onima koja su vezana na raspršene čestice ili nataložena u sedimentu (Naimo, 1995). Osobina dobrog bioindikatora je svakako njegova brojnost, koja je kod slatkovodnih mekušaca vrlo varijabilna, budući da na nju utječe niz faktora kao što su vrsta supstrata, temperatura, strujanje vode, dostupnost hrane itd. Određene vrste školjkaša imaju dovoljno dug životni vijek, što ih čini pogodnima za mnoga istraživanja. Problem se može pojaviti kad se zbog potreba istraživanja organizam mora premjestiti s jednog lokaliteta na drugi, kako bi se istražio utjecaj novog okoliša na organizam. U takvim slučajevima može doći do odgode očekivanih promjena u organizmu,

budući da na početku u novom okolišu organizam raste i akumulira metale jednakom brzinom kao u starom okolišu (Ware, 1991).

Iako se u mnogim istraživanjima koriste kao bioindikator, neke su vrste školjkaša vrlo otporne na zagađivala, što ih čini manje osjetljivim bioindikatorima. Visoka razina tolerancije na metale u vodi može ukazivati na adaptaciju na zagađenje. Pri izloženosti povišenoj koncentraciji metala, školjkaši sintetiziraju kemijske spojeve koji vežu metale (npr. metalotioneine) kako bi povećali svoju otpornost i zaštitili se od toksičnih učinaka metala. Drugi obrambeni mehanizam školjkaša je povlačenje u školjku. To je učinkovita zaštita tijekom kratkotrajnih nepovoljnih uvjeta, što može utjecati na istraživanja odgovora organizma na akutnu toksičnost (Ware, 1991). Školjkaši pokazuju određeni odgovor na povišenu koncentraciju metala u okolišu u vidu poprimanja zelenkaste boje i stanjenja ljusaka, proizvodnje manjeg broja bisusnih niti, abnormalnog razvoja ličinke i odraslih stadija, smanjenja brzine otkucaja srca i filtracije, zatvaranja školjke na dulje vrijeme (Katsallah i sur., 2013).

Visoka koncentracija metala u vodi ne mora uvijek značiti da će i koncentracija metala u školjkašu biti visoka. Ako je koncentracija metala u vodi visoka, ali nisu biorasploživivi, neće imati utjecaj na fiziologiju i funkciju organa školjkaša (Katsallah i sur., 2013). Školjkaši mogu akumulirati vrlo visoke koncentracije metala i metaloida, razmjernje koncentracijama istih u okolišu. Međutim, koncentracija metala u vodenim organizmima, odnosno bioakumulacija u školjkašima, ne ovisi samo o koncentraciji metala u okolišu nego i o mnogim biološkim faktorima: starosti organizma, masi, genotipu, fenotipu, brzini rasta, prehrani, spolu i reproduktivnom stanju. Među školjkašima se bioakumulacija može znatno razlikovati od vrste do vrste. Za pretpostaviti je da će unos i akumulacija metala kod detritivora korelirati s koncentracijama metala u sedimentu, dok će akumulacija kod filtratora korelirati s koncentracijama metala u vodi (Gupta i Singh, 2011).

Školjkaši roda *Anodonta* korišteni su kao bioindikator za praćenje onečišćenja metalima u različitim tipovima slatkih voda. *Anodonta woodiana* u radu Liu i sur. (2010) korištena je kao bioindikator u jezeru Tai na istoku Kine, pri čemu je analizirano 13 metala u tragovima: krom (Cr), mangan (Mn), željezo (Fe), kobalt (Co), nikal (Ni), bakar (Cu), cink (Zn), arsen (As), selenij (Se), molibden (Mo), srebro (Ag), kadmij (Cd) i olovo (Pb). U svom istraživanju Manly i George (1977) analizirali su metale (Zn, Ni, Pb, Cd, Cu i Hg) u tkivu školjkaša

Anodonta anatina duž rijeke Temze u Engleskoj. Kao bioindikatorski organizam u ovom radu odabrana je vrsta *Anodonta exulcerata*.

1.4. Biomarkeri izloženosti i toksičnih učinaka metala

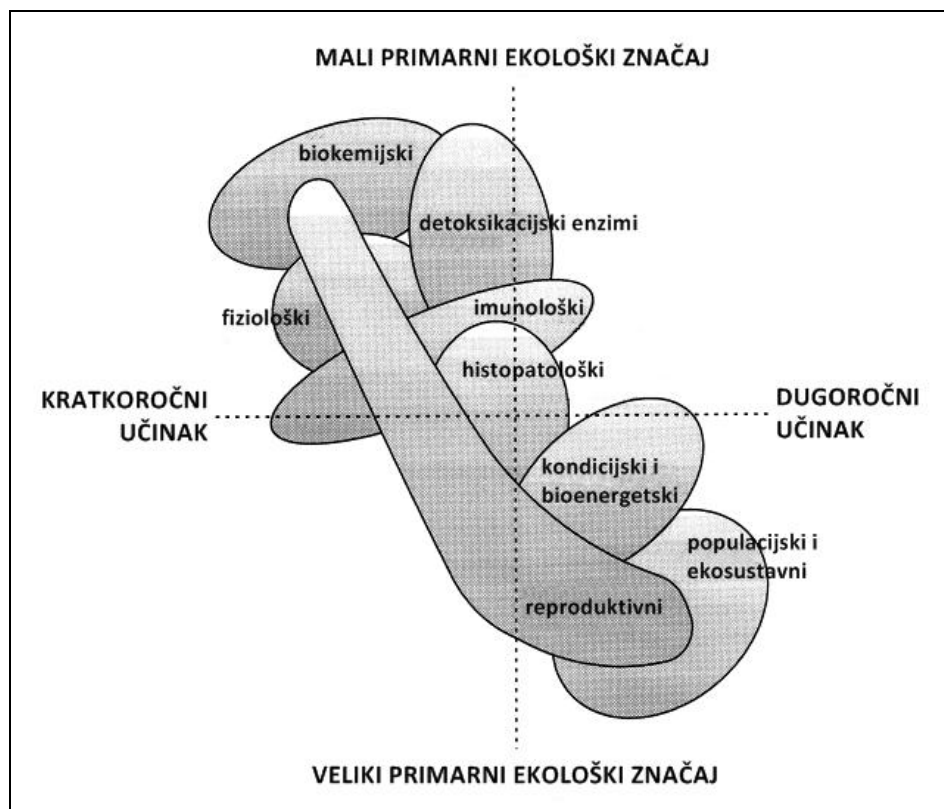
Metali u stanicu ulaze preko stanične membrane procesom olakšane difuzije, aktivnog transporta ili pinocitoze te se tamo vežu na ligande. Biološki neophodni metali u stanici zbog kemijske sličnosti mogu biti zamijenjeni toksičnim metalima, što može rezultirati poremećajima funkcija u stanici ili smrtnim ishodom. Da bi se to izbjeglo, aktiviraju se različiti homeostatski mehanizmi (Mason i Jenkins, 1995). Organizmi na izloženost visokim koncentracijama metala reagiraju na dva načina: patološkim odgovorom na uzrokovane poremećaje u normalnim biokemijskim reakcijama i poticanjem stvaranja proteina koji vežu toksične tvari (Ware, 1991).

Metali akumulirani u tkivu organizma i, općenito, stresni uvjeti u okolišu uzrokuju prekomjernu produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) u stanici te tako izazivaju oksidacijski stres, koji vodi do promjena u fiziologiji. ROS u malim količinama imaju signalnu ulogu, no u većim količinama u stanici može dovesti do oštećenja makromolekula kao što su DNA, lipidi i proteini. Stanice posjeduju mehanizme zaštite od povišene količine ROS, neenzimske antioksidanse i antioksidacijske enzime, koji se mogu jednostavno izmjeriti te se zbog toga koriste kao biomarkeri (Štambuk, 2011).

Biomarkeri su mjerljivi indikatori promjena u biološkom odgovoru na molekularnoj, staničnoj, biokemijskoj, fiziološkoj ili biheviorističkoj razini. Koriste se u mjerenju utjecaja izloženosti ili toksičnosti kemijskih tvari, koje izazivaju specifični i mjerljivi učinak na određenim mjestima u organizmu (Farris i Van Hassel, 2007). Biomarkeri nižih razina bioloških sustava imaju mali prognostički potencijal, ali brže detektiraju promjene i specifičniji su. Biomarkeri viših razina bioloških sustava imaju veći prognostički potencijal, ali zakašnjelu detekciju i nižu specifičnost (Slika 1) (Adams i sur., 1989). Biomarkeri uključeni u detoksikaciju ksenobiotika i njihovih metabolita predmet su brojnih istraživanja. U procjeni izloženosti utjecaju okolišnih čimbenika dijele se na biomarkere izloženosti i biomarkere učinka (Farris i Van Hassel, 2007).

Biomarkeri izloženosti ukazuju na izloženost organizma kemikalijama. To su npr. indukcija citosolnih proteina metalotioneina, indukcija citokrom P450 ovisnih oksidaza itd. Biomarkeri izloženosti ne mogu dati informaciju o toksičnom učinku na razini organizma. Biomarkeri

učinka ukazuju na izloženost organizma kemikalijama i učinak kemikalije u organizmu. Odnose se na nepoželjne promjene, oštećenja organizma zbog izloženosti kemikalijama. To su npr. specifični DNA adukti, oštećenja DNA, stvaranje mikronukleusa, inhibicija acetil-kolin esteraze (AChE), različite druge inhibicije enzima neophodnih za homeostazu itd. (Koeman i sur., 1993).



Slika 1. Specifičnost i značajnost biomarkera na različitim razinama biološke organizacije (prilagođeno prema Adams i sur., 1989).

1.4.1. Metalotioneini (MT)

Školjkaši posjeduju mnoge detoksikacijske mehanizme kojima kontroliraju unos, raspodjelu metala u tijelu i njihovu eliminaciju. Ti mehanizmi uključuju jednostavne načine izbjegavanja unosa metala (zatvaranje školjke, smanjena stopa filtracije i respiracije), kao i složenije načine (npr. indukcija metalotioneina) (Farris i Van Hassel, 2007).

Metalotioneini (MT) su cisteinom bogati termostabilni polipeptidi niske molekulske mase koji vežu metale. Ne sadrže aromatske aminokiseline ni histidin. Prvi put su otkriveni u kori bubrega konja kao proteini koji vežu kadmij. Široko su rasprostranjeni i prisutni u prokariotima i eukariotima. Imaju ulogu u regulaciji esencijalnih metala (cinka i bakra) te u

njihovoj detoksikaciji, kao i detoksikaciji neesencijalnih metala (kadmija i žive) (Roesijadi, 1992). Štite stanicu od toksičnih učinaka metala tako što na sebe vežu katione teških metala i detoksiciraju suvišak metala u stanici (Gupta i Singh, 2011). Istraživanje funkcije i uloge metalotioneina važan je korak u razumijevanju odgovora organizama na zagađenje u okolišu (Roesijadi, 1992).

Metalotioneini su, s obzirom na smještaj cisteinskih ostataka u aminokiselinskoj sekvenci, podijeljeni u tri klase:

- klasa I – MT kralježnjaka, mekušaca i rakova
- klasa II – MT *Drosophila*, morskih ježinaca, oblića, gljiva i cijanobakterija
- klasa III – MT biljaka (Amiard-Triquet i sur., 2013)

Postoji više oblika (izoformi) metalotioneina, pogotovo u beskralježnjaka, što može ukazivati na to da različiti oblici imaju različite uloge. Ako polimorfizam u strukturi metalotioneina određuje njihovu ulogu u regulaciji metala, to može biti vrlo važno za funkcioniranje stanice. Međutim, potrebno je obaviti dodatna istraživanja na ovu temu (Roesijadi, 1992).

Često se kao glavna uloga metalotioneina navodi homeostatska regulacija unutarstaničnih metala. Ovaj opis nije u potpunosti točan, budući da je definicija homeostaze održavanje stalnih uvjeta u biološkom sustavu, a ne sama regulacija funkcije. Kako se metabolizam mijenja i organizam ulazi u fazu rasta, razvoja ili reprodukcije, tako se i potreba za metalima mijenja, a posljedica toga je promjena koncentracije metala u stanicama. Homeostatska funkcija metalotioneina može se stoga definirati kao regulacija dostupnosti metala kod funkcija koje ovise o metalima, jer regulira pristup metala određenim mjestima unutar stanice. Ako je organizam bio izložen niskim, ali povišenim koncentracijama metala te je došlo do indukcije metalotioneina, može doći do povećane otpornosti na metale u budućnosti. Metalotioneini su kod akvatičkih organizama koncentrirani u jetri (ili ekvivalentnim organima u beskralježnjaka), bubrezima, škragama i probavnom sustavu, odnosno u organima povezanim s unosom tvari, detoksikacijom i ekskrecijom (Roesijadi, 1992).

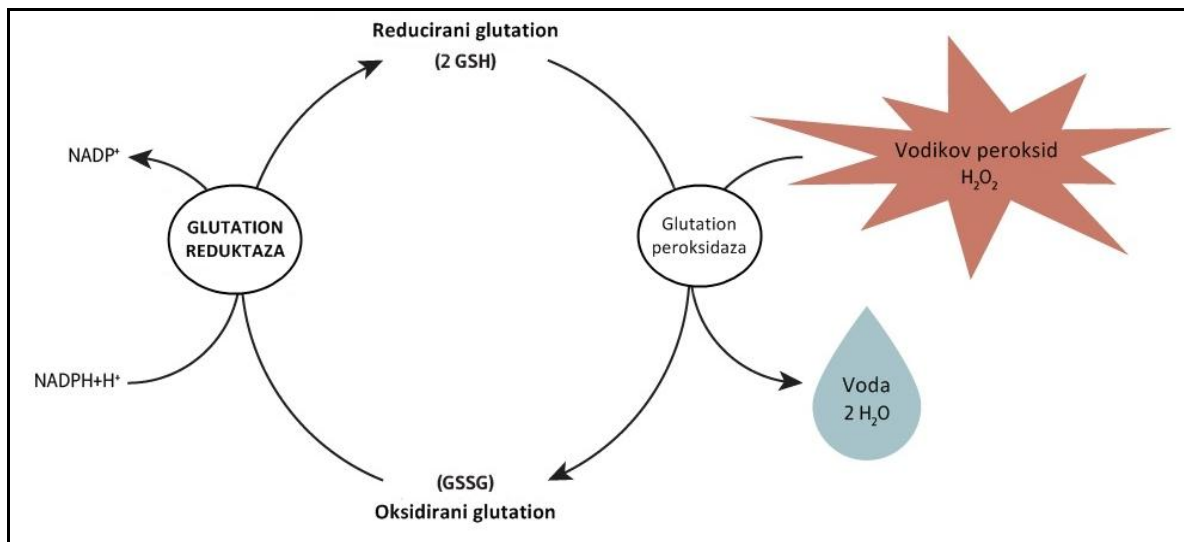
Metalotioneini se koriste kao indikatori zagađenja metalima, ali koncentracija metalotioneina u stanici ovisi o mnogim faktorima, kao što su vrsta hrane i staništa, reproduktivna aktivnost i rast (Ware, 1991; Viarengo i sur., 1999). Prednosti metalotioneina kao indikatora zagađenja su njihova osjetljivost, specifičnost i njihova sposobnost da rano upozore na nepovoljne

promjene. Koriste se kao indikatori narušenog zdravlja u ranom stadiju, prije pojave smrtonosnih promjena. Problem u korištenju metalotioneina kao indikatora je još uvijek nedovoljno razumijevanje njihove funkcije i indukcije pojavom metala (Roesijadi, 1992).

Razina metalotioneina nije direktno korelirana s koncentracijama organskih zagađivala jer su MT školjkaša proteini koji ukazuju primarno na stres izazvan biološkim učinkom anorganskih zagađivala (Viarengo i sur., 1999). Školjkaši roda *Anodonta* često u svom tkivu sadrže visoke koncentracije različitih metala. U dosadašnjim istraživanjima metalotioneina kod roda *Anodonta* najčešće se spominje kadmij, čija koncentracija u tkivu školjkaša korelira s razinom metalotioneina (Couillard i sur., 1993; Streit i Winter, 1993). Za razliku od kadmija, koncentracije bakra i cinka nisu u korelaciji s razinom metalotioneina, što je moguća posljedica homeostatske regulacije Cu i Zn (Couillard i sur., 1993). U istraživanju koje su proveli Stolyar i sur. (2005), nakon izlaganja školjkaša povišenim koncentracijama bakra došlo je do značajnog (dvostrukog) povećanja razine izoforma MT-2. Slične rezultate dobili su Nugroho i Frank (2012), gdje je povišenje razine MT u korelaciji s povećanjem koncentracije bakra u svim istraživanim organima školjkaša roda *Anodonta*.

1.4.2. Glutation (GSH)

Jedan od neenzimskih antioksidansa je glutacion (GSH). GSH štiti stanicu tako što neutralizira potencijalno štetno djelovanje slobodnih radikala, a pri tome ne postaje nestabilan. GSH je tripeptid, glutamil-cisteinil-glicin. Sadrži reduciranu tiolnu skupinu (Forman i sur., 2009). GSH ima ulogu u zaštiti stanice od lipidne peroksidacije koju uzrokuju neki metali te u sprječavanju nastajanja vrlo reaktivnih radikala. GSH djeluje kao prva linija obrane stanice, dok još nije došlo do indukcije metalotioneina (Canesi i sur., 1999). Reducirani GSH veže metale na cistein i uklanja superoksidne radikale i vodikov peroksid, pri čemu dolazi do njegove oksidacije u glutacion disulfid (GSSG), koji je toksičan za stanicu. Prijelaz GSH u oksidirani oblik, GSSG, ukazuje na unutarstanični stres. Enzim glutacion-reduktaza (GR) prevodi GSSG natrag u reducirani oblik (Slika 2) (Langston i Bebianno, 1998).



Slika 2. Shema oksidoreduktivnog ciklusa glutationa (preuzeto i prilagođeno s URL 1)

1.4.3. Malondialdehid (MDA)

Jedna od posljedica oksidacijskog stresa je lipidna peroksidacija, koja vodi do oštećenja makromolekula, tj. lipida. Nekoliko istraživanja ukazalo je na povezanost povećane lipidne peroksidacije u organizmima i povišene koncentracije ksenobiotika i zagađivala u vodi i sedimentu (Doyotte i sur., 1997). Lipidna peroksidacija pogađa polinezasićene masne kiseline u membranama stanica. Zbog stresnih uvjeta dolazi do aktivacije kisika te nizom reakcija nastaju štetni konjugirajući dieni, lipidni peroksi radikali i lipidni hidroperoksidi. Vrlo reaktivni lipidni peroksi radikal započinje lanac nepovoljnih reakcija, a kao proizvod procesa lipidne peroksidacije nastaje malondialdehid (MDA). MDA se koristi kao biomarker oksidativnog stresa (Del Rio i sur., 2005).

1.5. Ciljevi rada

Istraživanja sedimenata Visovačkog jezera ukazala su na povećanje razine nekih ekotoksičnih metala kao posljedicu antropogenog djelovanja. Međutim, do sada ne postoje podaci o akumulaciji metala niti o potencijalno toksičnom djelovanju metala na organizme koji obitavaju u Visovačkom jezeru. Također, ne postoje istraživanja o razlikama u izloženosti biote metalima s obzirom na dubinu jezera. Stoga je osnovni cilj ovog rada bio istražiti izloženost metalima slatkovodnog školjkaša *Anodonta exulcerata* (por. Unionidae) u Visovačkom jezeru, s naglaskom na istraživanju razlika u izloženosti između školjkaša koji obitavaju u plićim i dubljim dijelovima jezera.

Specifični ciljevi rada su sljedeći:

- istražiti postoje li razlike u koncentracijama metala u vodi na plićem (2-4 m) i dubljem (13 m) dijelu Visovačkog jezera;
- istražiti postoje li razlike u akumulaciji metala u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* s obzirom na dubinu uzorkovanja te može li koncentracija metala u vodi objasniti varijacije koncentracija metala u probavnoj žlijezdi školjkaša;
- istražiti djelovanje akumuliranog metala na školjkaše određivanjem razine molekularnih biomarkera izloženosti i učinaka zagađivala, metalotioneina, ukupnog glutaciona, malondialdehida i ukupnih proteina te vidjeti mogu li koncentracije elemenata u tkivu objasniti varijacije u razini analiziranih biomarkera;
- odrediti sadržaj metala u citosolnoj frakciji tkiva probavne žlijezde kao novi pristup u procjeni izloženosti metalima koji pruža informaciju o metabolički raspoloživoj, a time i potencijalno toksičnoj frakciji tkivnog metala;
- istražiti promjene u raspodjeli metala između topljive (koja sadrži citosolne proteine i mikrosome i smatra se potencijalno toksičnom frakcijom metala) i netopljive (koja uključuje granule, dijelove staničnih membrana, mitohondrije, lizosome i peroksisome te se smatra da sadrži detoksicirani metal) frakcije tkiva probavne žlijezde pri povećanoj akumulaciji metala u probavnoj žlijezdi.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja

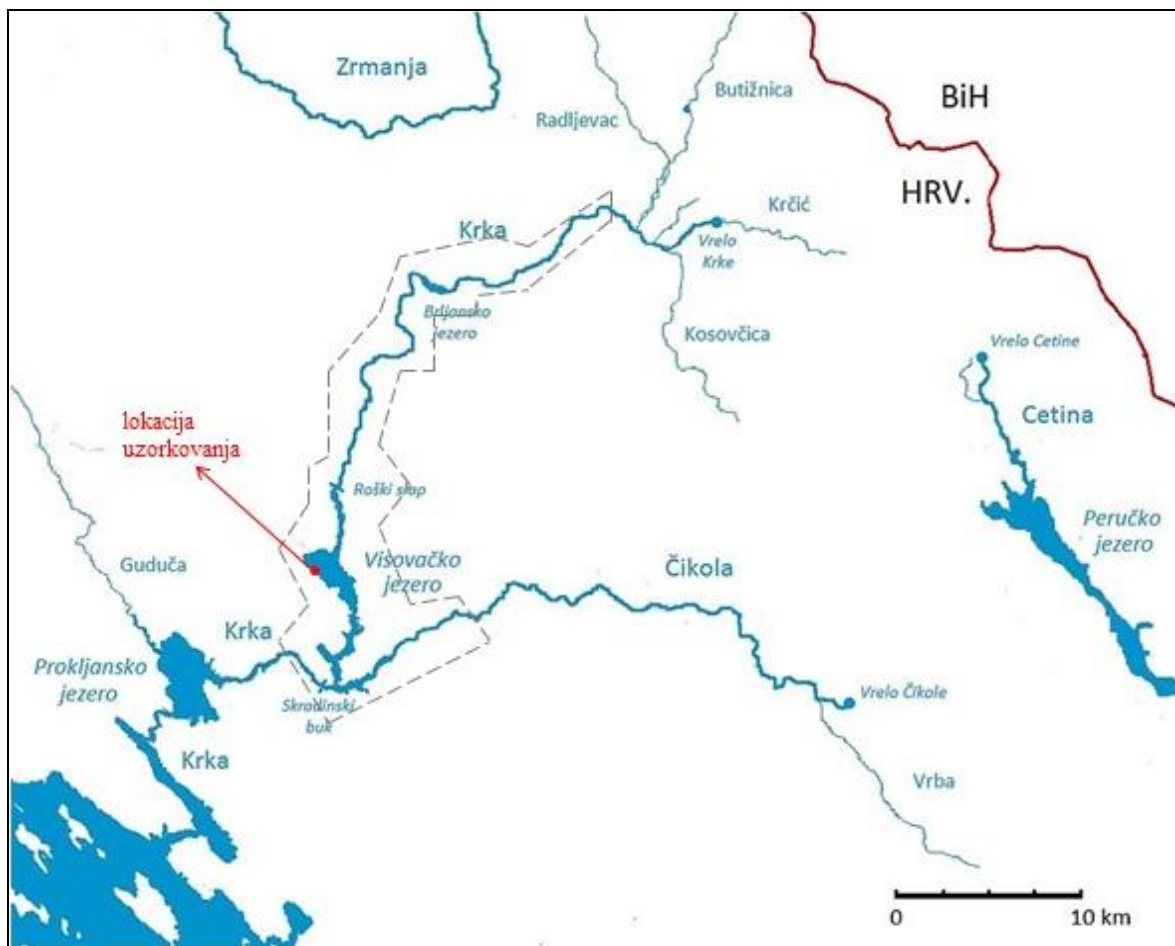
Visovačko jezero dio je ekosustava rijeke Krke te se nalazi unutar granica Nacionalnog parka Krka (Slika 3). Krka je dalmatinska krška rijeka na području Šibensko-kninske županije. Izvire u podnožju planine Dinare, nedaleko od grada Knina. Pritoke Krke u slatkovodnom dijelu su Krčić, Kosovčica, Orašnica, Butišnica i Čikola s Vrbom, a u potopljenom dijelu ušća Guduča. U toku rijeke Krke nalaze se tri jezera: Brljansko (jedino umjetno), Visovačko i Prokljansko. U Jadransko more ulijeva se u Šibenskom zaljevu (URL 2).

Zbog svoje geomorfologije i hidrologije, krška područja vrlo su osjetljiva na antropogeno zagađenje (Cukrov i sur., 2008). U okolini rijeke Krke nalaze se uglavnom manja naselja, stoga antropogeni utjecaj na rijeku nije značajan, s iznimkom grada Knina u kojem postoje tri ispusta bez pročišćivača. Iz Knina potječe najveća količina otpadnih voda u gornjem dijelu toka Krke. Trenutni pritisak od poljoprivrede na površinske vode nije značajan budući da se od raspoloživih poljoprivrednih površina trenutno koristi samo manji dio. Međutim, Visovačko i Prokljansko jezero zbog svoje su visoke ekološke osjetljivosti izloženi riziku od zagađenja od strane poljoprivrednih djelatnosti u budućnosti (Šorgić i Antunović, 2010). Oživljavanje gospodarskih aktivnosti, poljoprivrede, industrije i turizma (u Nacionalnom parku Krka) također uzrokuje povećano antropogeno opterećenje, što posebno ugrožava stagnantne (jezerske) dijelove rijeke Krke u kojima dolazi do nakupljanja antropogenih sastojaka zbog sporije izmjene i duljeg vremenskog zadržavanja vode (Goreta, 2013).

Visovačko jezero sedreno je jezero površine od 7,7 km², najveće dubine do 55 m. Monomiktičko je, s izraženom termičkom stratifikacijom tijekom ljeta i izotermijom tijekom zime (Šapina, 2014). U donji dio jezera ulijeva se rijeka Čikola. Sporotekuća slatka voda Visovačkog jezera pogoduje razvoju vodene i močvarne vegetacije u uvalama (Marguš, 2015). Visovačko jezero stanište je nekoliko endemičnih slatkovodnih vrsta riba (Radović i sur., 2009).

Jezero karakterizira značajan dotok slatkih voda iz rijeka Krke i Čikole, što je jedan od glavnih faktora eutrofikacije, ali i put unosa antropogenih sastojaka (Goreta, 2013). S obzirom na trofiju, Visovačko jezero je oligomezotrofnu, ali pokazuje porast eutrofikacije u

posljednjih nekoliko godina (Ujčić, 2015), koji rezultira nepovoljnim pojavama kao što su pridnene hipoksije i anoksije. Teško je odvojiti antropogeni utjecaj od stalno prisutne prirodne eutrofikacije, stoga je procjena antropogenog utjecaja u cjelokupnom eutrofikacijskom pritisku na Visovačko jezero vrlo zahtjevna (Goreta, 2013). Voda iz Visovačkog jezera u budućnosti je predviđena za ljudsku potrošnju, budući da se tijekom posljednjih desetak godina kakvoća vode popravljala. Jedini problem stvara povećana količina fosfora u vodi (Šorgić i Antunović, 2010). Cukrov i sur. (2013) mjerili su metale u sedimentu Visovačkog jezera te su došli do zaključka da su svi analizirani metali i elementi u tragovima terigenog porijekla, osim cinka, koji se u sedimentu nalazio u povišenoj koncentraciji kao rezultat antropogenih aktivnosti u gradu Kninu.



Slika 3. Karta područja istraživanja s označenom lokacijom uzorkovanja. Isprekidanom linijom naznačene su granice Nacionalnog parka Krka (preuzeto i prilagođeno s URL 3).

2.2. Uzorkovanje

2.2.1. Uzorkovanje školjkaša

Uzorci školjkaša za ovo istraživanje prikupljeni su u Visovačkom jezeru u svibnju 2016. godine, u sklopu uzorkovanja provedenih u okviru projekta „Akumulacija, unutarstanično mapiranje i učinci metala u tragovima u akvatičkih organizama“ (AQUAMAPMET) Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ). Za uzorkovanje je dobiveno odobrenje Ministarstva zaštite prirode i okoliša (klasa: UP/I 612-07/16-33/07, urbroj: 517-07-2-1-1-16-2 od 16. veljače 2016. godine). Uzorkovanje je obavljeno na lokaciji na desnoj obali Visovačkog jezera (Slika 3). Školjkaši su za ovo istraživanje uzorkovani u plićem (1-3 m) i dubljem (~13 m) dijelu jezera. Uzorci školjkaša prikupljeni su ronjenjem autonomnom ronilačkom opremom s komprimiranim zrakom (Slika 4). Na svakoj dubini prikupljeno je 20 jedinki.



Slika 4. Fotografija uzorkovanja školjkaša na Visovačkom jezeru autonomnim ronjenjem (snimila dr. sc. Marijana Erk).

Nakon 24-satne purifikacije uslijedila je sekcija školjkaša. Izdvojena je probavna žlijezda i pohranjena na -80 °C za daljnju obradu i analizu. Prije sekcije, određeni su osnovni biometrijski pokazatelji uzorkovanih školjkaša:

- duljina školjke (cm)
- širina školjke (cm)
- visina školjke (cm)
- volumen školjke: duljina školjke × širina školjke × visina školjke (cm³)
- masa otvorenog ocijeđenog školjkaša (g)
- masa školjke (g)
- masa mesa (g)
- indeks kondicije na volumen (%): (masa mesa (g)/volumen školjke (cm³)) × 100

2.2.2. Uzorkovanje vode

Uzorci jezerske vode za analize metala uzeti su na istim dubina na kojima su uzorkovani i školjkaši. Uzorci su uzimani u triplicatu u polietilenskim bocama od 0,5 L. Kako bi se spriječilo onečišćenje uzoraka vode metalima, boce su prije uzorkovanja namakane u 10 % dušičnoj kiselini (p.a., Kemika, Hrvatska) te temeljito isprane ultračistom vodom (Milli Q). Neposredno nakon uzorkovanja, uzorci su profiltrirani kako bi se odijelila otopljena frakcija metala od partikularne. Za filtraciju su korišteni filteri za špricu od celuloznog acetata promjera pora 0,45 µm (Sartorius, Njemačka). Dobiveni filtrati su zakiseljeni dodavanjem koncentrirane dušične kiseline (65 %, Suprapur, Merck, Njemačka) tako da je konačna koncentracija kiseline u uzorku iznosila 1,3 % (v/v). Zakiseljeni uzorci pohranjeni su na 4 °C do daljnje analize u laboratoriju.

2.3. Indikatorski organizam

Kao indikatorska vrsta za istraživanje odabran je školjkaš *Anodonta exulcerata* (Porro, 1838) koji je u Visovačkom jezeru zastupljen u velikom broju (Slika 5).



Slika 5. Fotografija uzorkovanih jedinki *Anodonta exulcerata* (snimila dr. sc. Marijana Erk).

Anodonta exulcerata (Porro, 1838) je autohtona vrsta, regionalni endem Apeninskog poluotoka i Hrvatske zapadno od Dinarida. Pripada porodici Unionidae, slatkovodnim školjkašima prisutnima na gotovo svim kontinentima. Od svih vrsta roda *Anodonta*, *A. exulcerata* je najrasprostranjenija na ovom području (Froufe i sur., 2017). Zbog velike sličnosti u morfologiji s vrstama *A. anatina* i *A. cygnea* (Slika 6) koje obitavaju u istoj regiji, determinacija na temelju morfoloških značajki vrlo je zahtjevna, stoga je za determinaciju vrste korištena molekularna metoda.

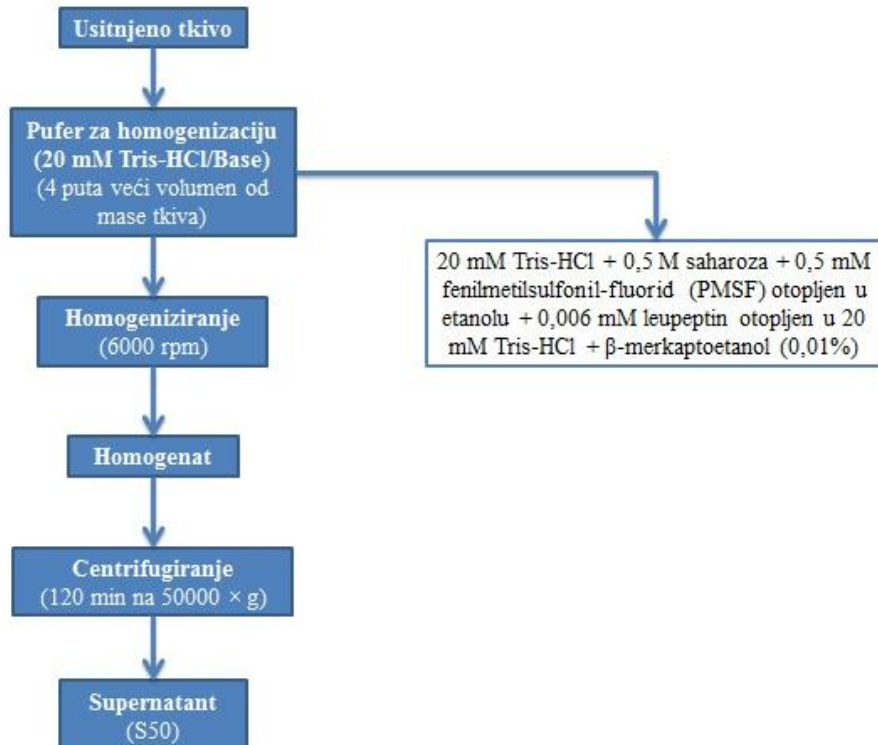


Slika 6. Europski školjkaši roda *Anodonta*, uz *A. exulcerata* (preuzeto i prilagođeno prema Lopes-Lima i sur., 2017).

Životni vijek europskih školjkaša roda *Anodonta* manji je od 30 godina, dok spolnu zrelost dostižu između 1. i 4. godine. U lentičkim staništima prevladavaju hermafroditске јединке, dok su gonohorističke јединке češće u lotičkim staništima. Oplođena јаја čuvaju u škrgama tijekom zime, a u razdoblju od ranog proljeća do лјета puštaju ličinke (glohидije). Glohидije su velike, trokutaste i imaju kukice za prihvaćanje na domadara (ribu). U izboru domadara su generalisti te se preobrazba iz ličinke u odraslu јединку može odvijati na ribama iz mnogih porodica. Europski predstavnici roda *Anodonta* vrlo su prilagodljivi na razna, čak i degradirana, staništa te dobro podnose eutrofikaciju (Lopes-Lima i sur., 2017).

2.4. Obrada tkiva probavne žlijezde u svrhu određivanja koncentracija ukupnih metala, citosolnih metala, citosolnih proteina i metalotioneina

Uzorci probavne žlijezde, prethodno čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, obrađeni su postupkom homogenizacije sa ciljem istiskivanja stanične tekućine iz tkiva. Cijeli postupak je shematski prikazan na Slici 7.



Slika 7. Shema postupka obrade tkiva u svrhu određivanja koncentracija metala (ukupni i citosolni metali), metalotioneina i citosolnih proteina.

Od svakog uzorka, prethodno pohranjenog na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, odvagano je 600 mg tkiva probavne žlijezde. Tkivo je usitnjeno škarama te mu je dodan svježe pripremljeni pufer za homogenizaciju u volumnom omjeru 1:4. Pufer za homogenizaciju sastoji se od:

- 20 mM Tris-HCl (Sigma, SAD, pH = 8,6 pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- 0,5 mM fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF, Sigma, SAD) otopljen u etanolu (Kemika, Hrvatska)
- 0,006 mM leupeptin (LEU, Sigma, SAD) otopljen u 20 mM Tris-HCl pH = 8,6
- β -merkaptoetanol (0,01 %) (Sigma, SAD)
- 0,5 M saharoza (Sigma, SAD)

Homogenizacija tkiva probavne žlijezde provedena je pomoću homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Everhjem GLAS-COL, SAD) pri 6000 okretaja u minuti (Slika 8). Tijekom cijelog postupka homogenizacije tkiva, uzorci, pufer za homogenizaciju i sav pribor držani su na ledu. Nakon homogenizacije, 300 μL homogenata odvojeno je sa ciljem određivanja ukupnih metala i prebačeno u epruvete za razgradnju te pohranjeno na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 8. Homogeniziranje tkiva u staklenoj epruveti homogenizatorom s teflonskim batićem (snimila izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner).

Preostali homogenat centrifugiran je u Avanti J-E centrifugi (Beckman Coulter, SAD) 120 min na $50000 \times g$. Dobiveni supernatant (S50) prebačen je Pasteurovom pipetom, izbjegavajući masnoće i talog, u novu ohlađenu epruvetu te razdijeljen u prethodno označene epruvete:

- $2 \times 300 \mu\text{L}$ za određivanje metala u citosolu u epruvete za razgradnju
- $2 \times 30 \mu\text{L}$ za citosolne proteine
- $2 \times 250 \mu\text{L}$ za MT

Alikvoti S50 za određivanje metala pohranjeni su na $4 \text{ }^\circ\text{C}$, a za određivanje MT i proteina na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5. Razgradnja homogenata i citosola

Uzorke homogenata i citosola prije određivanja metala bilo je potrebno razgraditi. Homogenati probavne žlijezde, odvojeni nakon homogenizacije i pohranjeni na $4 \text{ }^\circ\text{C}$, razgrađeni su dodatkom oksidacijske smjese (v/v 1:3) koja sadrži koncentriranu HNO_3 (*Rotipuran Supra 69 %*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Njemačka) i $30 \text{ } \%$ H_2O_2 (*Suprapur*, Merck, Njemačka) u omjeru 3:1 (v/v). Razgradnja je provedena u sušioniku pri $85 \text{ }^\circ\text{C}$, tijekom 3,5 sati. Nakon hlađenja, razgrađeni homogenati razrijeđeni su Milli Q vodom 5 puta za elemente u tragovima (konačna koncentracija HNO_3 oko $8 \text{ } \%$), odnosno 20 puta za makroelemente (konačna koncentracija HNO_3 oko 2%).

Kod citosolne frakcije razgradnja je provedena u duplikatima, dodavanjem iste oksidacijske smjese kao za homogenate, ali u volumnom omjeru 1:1 te zagrijavanjem u laboratorijskom sušioniku na $85 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 3,5 sata. Razgrađeni citosoli razrijeđeni su Milli Q vodom 5 puta za elemente u tragovima i Ca (konačna koncentracija HNO_3 oko 5%), odnosno 20 puta za makroelemente Mg, Na i K (konačna koncentracija HNO_3 oko $1,2 \%$).

2.6. Određivanje koncentracije metala i metaloida

Koncentracije metala određene su u zakiseljenim filtratima uzoraka jezerske vode bez prethodne razgradnje te u uzorcima homogenata i citosola probavne žlijezde koji su prethodno

razgrađeni postupkom opisanim u poglavlju 2.5. Koncentracija elemenata u tragovima u jezerskoj vodi mjerena je direktno iz zakiseljenih filtrata uzoraka jezerske vode (HNO_3 , 1,3 % v/v), a koncentracija makroelemenata izmjerena je nakon razrjeđenja filtrata 10 puta.

Mjerenje koncentracije 26 elemenata u tragovima i 4 makroelementa provedeno je metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom na uređaju HR ICP-MS Element 2 (Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) opremljenom automatskim uzorkivačem SC-2 DX FAST (Elemental Scientific, SAD) (Slika 9).



Slika 9. Maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS) (snimila dr. sc. Vlatka Filipović Marijić).

HR ICP-MS je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrofotometrijom. Tipični instrumentalni uvjeti i mjerni parametri opisani su u radu Fiket i sur. (2007).

Vanjska kalibracija mjerenja provedena je pripremom odgovarajućih standarda iz multielementne standardne otopine koja sadrži Na, K, Mg i Ca (Fluka, Njemačka), standardne otopine koja sadrži Ag (Fluka, Njemačka) i multielementne standardne otopine za elemente u tragovima (Analytika, Češka Republika) s dodatkom Rb (Sigma-Aldrich, SAD) i Cs (Fluka, Njemačka). Svi kalibracijski standardi pripremljeni su u 1,3 % HNO_3 (*Suprapur*, Merck, Njemačka). Neposredno prije mjerenja, u sve uzorke, kalibracijske standarde i slijepu probu kao interni standard dodan je In ($1 \mu\text{g/L}$, Fluka, Germany). Za provjeru točnosti mjerenja na HR ICP-MS korišten je kontrolni uzorak za mjerenje metala u tragovima (QC trace metals, kataloški broj 8072, serijski broj 146142-146143, UNEP/GEMS, Burlington, Kanada) i

kontrolni uzorak za mjerenje minerala (QC minerals, kataloški broj 8052, serijski broj 146138–146139; Burlington, Kanada).

Mjerenje koncentracija ^7Li , ^9Be , ^{82}Se , ^{85}Rb , ^{98}Mo , ^{109}Ag , ^{111}Cd , ^{120}Sn , ^{121}Sb , ^{133}Cs , ^{205}Tl , ^{208}Pb , ^{209}Bi i ^{238}U provedeno je na niskoj rezoluciji; ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{42}Ca , ^{47}Ti , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{79}Se , ^{86}Sr i ^{138}Ba na srednjoj rezoluciji; a ^{39}K i ^{75}As na visokoj rezoluciji.

Granice detekcije za mjerenje koncentracija u filtriranim uzorcima vode izračunate su kao tri standardne devijacije deset uzastopnih mjerenja metala/metaloida u slijepom uzorku (Milli Q voda, 1,3 % HNO_3), a iznosile su (u $\mu\text{g/L}$): Li 0,006, Se 0,059, Rb 0,003, Mo 0,011, Ag 0,064, Cd 0,002, Sn 0,012, Sb 0,001, Cs 0,001, Tl 0,000, Pb 0,071, Bi 0,005, U 0,003, Al 0,436, Ti 0,120, V 0,002, Cr 0,060, Mn 0,050, Fe 0,624, Co 0,019, Ni 0,095, Cu 0,401, Zn 7,340, Se 0,059, As 0,028, Sr 0,182, Ba 0,149, Mg 6,041, Ca 21,190, Na 5,605 i K 1,977.

Granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u homogenatima probavne žlijezde izračunate su kao tri standardne devijacije pet mjerenja metala/metaloida u slijepom uzorku (pufer za homogenizaciju opisan u poglavlju 2.4.), razgrađenom prema proceduri za homogenat opisanoj u poglavlju 2.5. Granice detekcije iznosile su (u $\mu\text{g/g}$ tkiva): Li 0,0009, Se 0,015, Rb 0,054, Mo 0,0025, Ag 0,0002, Cd 0,001, Sn 0,0026, Sb 0,0014, Cs 0,0002, Tl 0,0003, Pb 0,0046, Bi 0,0005, U 0,0002, Al 0,328, Ti 0,013, V 0,0015, Cr 0,028, Mn 0,111, Fe 5,46, Co 0,0002, Ni 0,0035, Cu 0,011, Zn 0,55, Se 0,015, As 0,016, Sr 0,033, Ba 0,025, Mg 11,33, Ca 2,95, Na 11,71 i K 1,34.

Granice detekcije za mjerenje koncentracija metala i metaloida u citosolima probavne žlijezde izračunate su kao tri standardne devijacije pet mjerenja metala/metaloida u slijepom uzorku (pufer za homogenizaciju opisan u poglavlju 2.4.), razgrađenom prema proceduri za citosol opisanoj u poglavlju 2.5. Granice detekcije iznosile su (u $\mu\text{g/g}$ tkiva): Li 0,001, Se 0,0034, Rb 0,0013, Mo 0,001, Ag 0,0001, Cd 0,0006, Sn 0,0017, Sb 0,0006, Cs 0,0001, Tl 0,0000, Pb 0,0055, Bi 0,0002, U 0,0000, Al 0,082, Ti 0,016, V 0,0004, Cr 0,005, Mn 0,0034, Fe 0,230, Co 0,0001, Ni 0,0009, Cu 0,0056, Zn 0,187, Se 0,0034, As 0,0087, Sr 0,0027, Ba 0,011, Mg 0,930, Ca 1,81, Na 1,19 i K 0,875.

Rezultati dobiveni mjerenjem u filtriranoj jezerskoj vodi predstavljaju koncentracije otopljenih metala/metaloida u vodi, a izraženi su kao $\mu\text{g/L}$ (elementi u tragovima) ili mg/L (makroelementi).

Rezultati dobiveni mjerenjem u razgrađenim homogenatima predstavljaju ukupne koncentracije metala/metaloida u probavnoj žlijezdi školjkaša, dok rezultati dobiveni mjerenjem u razgrađenim citosolima predstavljaju koncentracije metala/metaloida u topljivoj, citosolnoj frakciji tkiva probavne žlijezde. Ukupne i citosolne koncentracije metala/metaloida u probavnoj žlijezdi izražene su u $\mu\text{g/g}$ vlažne mase tkiva.

Mjerenje je provedeno u suradnji s dr. sc. Zrinkom Dragun iz Laboratorija za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.

2.7. Određivanje koncentracije staničnih biomarkera

2.7.1. Kvantitativno određivanje metalotioneina

Određivanje koncentracije MT u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata* provedeno je prema metodi opisanoj u radu Viarengo i sur. (1997) koja je u Laboratoriju za biološke učinke metala prilagođena na manji volumen uzorka (Horvat, 2016), odnosno na 250 μl umjesto 1 ml u standardnoj metodi. Djelomično pročišćeni i koncentrirani uzorak metalotioneina priprema se diferencijalnim frakcijskim taloženjem proteina mješavinom organskih otapala etanola, (Kemika, Hrvatska) i kloroforma (Kemika, Hrvatska) (tzv. etanolna precipitacija). U sljedećem koraku određuje se koncentracija metalotioneina spektrofotometrijskom metodom temeljenom na reakciji tiolnih skupina cisteina s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB, Ellmanov reagens) (Sigma, SAD).

2.7.1.1. Etanolna precipitacija

Tijekom cijelog postupka etanolne precipitacije epruvete s uzorcima, kao i sve posude, držane su na ledu, a otapala i pufer za ispiranje prethodno su ohlađeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kako pri povišenoj temperaturi alkohol ne bi uzrokovao denaturaciju proteina. Etanolna precipitacija provedena je na supernatantu S50 (citosol), a taloženje je izvedeno u Eppendorf epruvetama od 1,5 i 2 mL.

U sljedeća tri koraka opisan je postupak etanolne precipitacije, izveden na ledu:

1. U prvom koraku provodi se uklanjanje visokomolekularnih proteina (molekulske mase iznad 20 000). U Eppendorf epruvete od 1,5 mL otpipetirano je 250 μL citosola S50, kojem je dodano 262 μL hladnog apsolutnog etanola ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) i 20 μL hladnog kloroforma ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

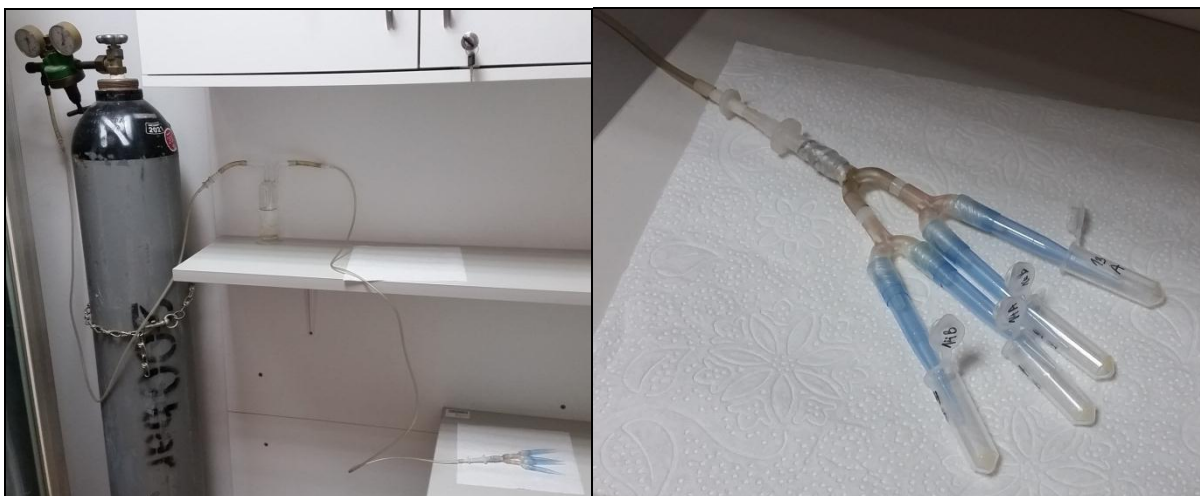
Uzorci su nekoliko sekundi promiješani na vrtložnoj miješalici MS1 (Ika-Works, Njemačka), a zatim centrifugirani u uređaju za centrifugu Biofuge Fresco (Kendro Laboratory Products, SAD) 6 minuta na $12\ 000 \times g$ pri $2\ ^\circ\text{C}$. Dobiveni supernatant (S12) preliven je u ohlađene Eppendorf epruvete od 2 mL.

2. U drugom koraku provodi se taloženje frakcije bogate metalotioneinima. U Eppendorf epruvete od 2 mL sa supernatantom dobivenom u prethodnom koraku dodano je 1,35 mL hladnog apsolutnog etanola ($-20\ ^\circ\text{C}$), što čini ~ 3 volumena supernatanta S12. Uzorci su dobro promiješani na vrtložnoj miješalici MS1 (Ika-Works, Njemačka), zatim ostavljeni 1 sat na $-20\ ^\circ\text{C}$, a nakon toga centrifugirani u centrifugi Biofuge Fresco (Kendro Laboratory Products, SAD) 6 minuta na $12\ 000 \times g$ pri $2\ ^\circ\text{C}$. Dobiveni supernatant je izliven, a Eppendorf epruvete ocijeđene su na filter papiru.

3. U trećem koraku provedeno je ispiranje taloga. U talog je dodano $700\ \mu\text{L}$ hladne otopine za ispiranje ($-20\ ^\circ\text{C}$) koju čine etanol/kloroform/pufer 20 mM Tris/HCl u volumnom omjeru 87:1:12. Ispiranjem su uklonjena eventualna zaostala onečišćenja niskomolekularnim topljivim tioletima. Uzorci su centrifugirani u centrifugi Biofuge Fresco (Kendro Laboratory Products, SAD) 6 minuta na $12\ 000 \times g$ pri $2\ ^\circ\text{C}$. Supernatant je izliven, a Eppendorf epruvete ocijeđene su na filter papiru.

Sljedeća dva koraka provedena su na sobnoj temperaturi:

4. Talozu u Eppendorf epruvetama osušeni su na struji dušika kako bi ispario sav alkohol (Slika 10).



Slika 10. Sušenje taloga na struji dušika.

5. Nakon sušenja, talozi su otopljeni u 35 μL 0.25 M NaCl te im je dodano 35 μL otopine 1 M HCl/4 mM EDTA. Potom su promiješani na vrtložnoj miješalici MS1 (Ika-Works, Njemačka).

2.7.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa (DTNB)

Koncentracija MT određena je spektrofotometrijskom metodom temeljenom na reakciji tiolnih skupina cisteina s Ellmanovim reagensom (5,5'-ditiobis-2- nitrobenzojevom kiselinom, DTNB). Reakcija je izvedena u prisutnosti EDTA koja oslobađa –SH skupine uklanjajući metale.

Kao referentni standard korišten je reducirani glutation (GSH) (Sigma-Aldrich, SAD). Osnovna otopina GSH (1 mg/ml u 0,25 M NaCl) priređivana je uvijek neposredno prije analize te je držana na ledu tijekom pravljenja niza standardnih otopina (2,5-30 μg). Otopina DTNB (0,43 M DTNB u 0,2 M NaH_2PO_4 puferu s dodatkom 2 M NaCl, pH = 8) također je priređivana neposredno prije analize te je do upotrebe držana u mraku na sobnoj temperaturi (Slika 11).



Slika 11. Vaganje DTNB i NaCl za pripremu svježe otopine prije analize.

Uzorci dobiveni etanolnom precipitacijom pripremljeni za određivanje sadržaja slobodnih – SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa. Standardne otopine GSH priređene su u rasponu od 2,5-30 µg GSH. Nakon pripreme, standardne otopine i uzorci promiješani su na vrtložnoj miješalici. Uzorci su centrifugirani 3 minute na $12\ 000 \times g$ pri 20 °C i preliveni u čiste Eppendorf epruvete od 1,5 mL. Ostavljeni su na inkubaciji 20 minuta na sobnoj temperaturi. 200 µl svakog uzorka/standarda prebačeno je u triplikatu u jažice mikroploče s 96 jažica. Aporbancija na 412 nm očitana je u fotometru za mikroploče Infinite M200 (Tecan, Švicarska). Iz kalibracijskog pravca napravljenog u programu Microsoft Excel određene su masene koncentracije MT u analiziranim uzorcima.

2.7.2. Kvantitativno određivanje ukupnog glutationa (tGSH)

Koncentracija ukupnog glutationa (GSH i GSSG) određena je DTNB-GSSG reduktaza reciklirajućim spektrofotometrijskim testom prema proceduri opisanoj u Akerboom i Sies (1981) s nekim modifikacijama. Metoda se temelji na reakciji GSH s DTNB pri čemu nastaje žuto obojeni TNB (5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina) i GS-TNB. Nastali disulfid GS-TNB se reducira do GSH uz pomoć glutation reduktaze i NADPH te tako uzrokuje recikliranje GSH i stvaranje novog TNB-a. TNB koji nastaje u reakciji proporcionalan je koncentraciji GSH u uzorku i moguće ga je kvantificirati na 412 nm.

Tkivo je usitnjeno, izvagano (30-40 mg) i homogenizirano u 5 volumena ledene 5% sulfosalicilne kiseline (Kemika, Hrvatska) u homogenizatoru s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Everhjem GLAS-COL, SAD) kako bi se uklonili proteini. Uzorci, a kasnije homogenat, tijekom cijelog su postupka držani na ledu, a zatim centrifugirani u Biofuge Fresco centrifugi (Kendro, SAD) pri $10000 \times g$ tijekom 10 minuta na 4 °C. Koncentracija SSA u uzorku treba biti 0,5-1 % jer visoka koncentracija SSA mijenja pH čime interferira s reakcijom GSH u testu, stoga je prije same analize dobivene supernatante trebalo dodatno razrijediti Milli Q vodom. Uzorci su pohranjeni na -80 °C.

Za kvantifikaciju GSH pripremljen je niz standarda GSH u rasponu 3,125-50 nM/mL koji će dati baždarnu krivulju za izračun koncentracije GSH u uzorcima.

Za analizu su svježe pripremljene otopine:

- pufer kalijevfosfat-EDTA (KPE) - 0,1 M fosfatni pufer s 1 mM EDTA (dinatrijeva sol), pH 7,5

- temeljna otopina DTNB - 3,79 mM DTNB u KPE (za pripremu radne otopine DTNB+GR dodano je 228 μ L temeljne otopine u 8 mL KPE)

- temeljna otopina glutation reduktaze, 6 U/mL KPE (GR, Sigma, SAD) (za pripremu radne otopine DTNB+GR dodano je 228 μ L temeljne otopine u 8 mL KPE)

- temeljna otopina NADPH – 1,92 mM NADPH u KPE

U mikroploču s 96 jažica dodano je po 20 μ L slijepo probe, standarda, odnosno uzorka. Uzorci su napravljeni u triplikatima. Višekanalnom pipetom dodano je 150 μ L radne otopine DTNB+GR po jažici. Sadržaj jažica je promiješan, pokriven aluminijskom folijom i ostavljen na sobnoj temperaturi 5 minuta. Zatim je u svaku jažicu višekanalnom pipetom dodano 50 μ L svježe pripremljene radne otopine NADPH (10 puta razrijeđena temeljna otopina) i odmah je očitana apsorbancija na 412 nm (6 očitavanja u intervalima od 1 minute tijekom 5 minuta).

Određena je brzina reakcije za standarde, korigirana za brzine reakcije u slijepoj probi te je napravljena baždarna krivulja. Određene su brzine reakcije u uzorku, korigirane za brzine reakcije u slijepoj probi te su iz jednadžbe pravca napravljenog u programu Microsoft Excel izračunate koncentracije GSH u analiziranim uzorcima.

2.7.3. Kvantitativno određivanje malondialdehida (MDA)

Za analizu sadržaja malondialdehida (MDA) korištena je S3 tkivna frakcija. Koncentracija MDA izmjerena je spektrofotometrijski. Spektrofotometrijsko mjerenje omogućuje reakcija MDA s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA), koja pri niskom pH i visokoj temperaturi stvara ružičasti fluorescentni produkt maksimalne apsorbancije na valnoj duljini 535 nm. Prije analize svježe su pripremljene otopine 10 % TCA (Kemika, Hrvatska), 0,67 % TBA (Alfa Aesar, SAD) i 1 % BHT (Sigma-Aldrich, SAD). Cijeli postupak opisan je u tri koraka:

1. Uzorci probavne žlijezde izrezani su na manje komadiće te im je dodan pufer za homogenizaciju (50 mM fosfatni pufer, pH = 7,2) u omjeru 1:4. Homogenizacija tkiva probavne žlijezde provedena je pomoću homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Everhjem GLAS-COL, SAD). Tijekom cijelog postupka homogenizacije tkiva, uzorci, sav pribor i pufer držani su na ledu. Dobiveni homogenati centrifugirani su u Biofuge Fresco centrifugi (Kendro, SAD) pri $3000 \times g$ tijekom 10 minuta

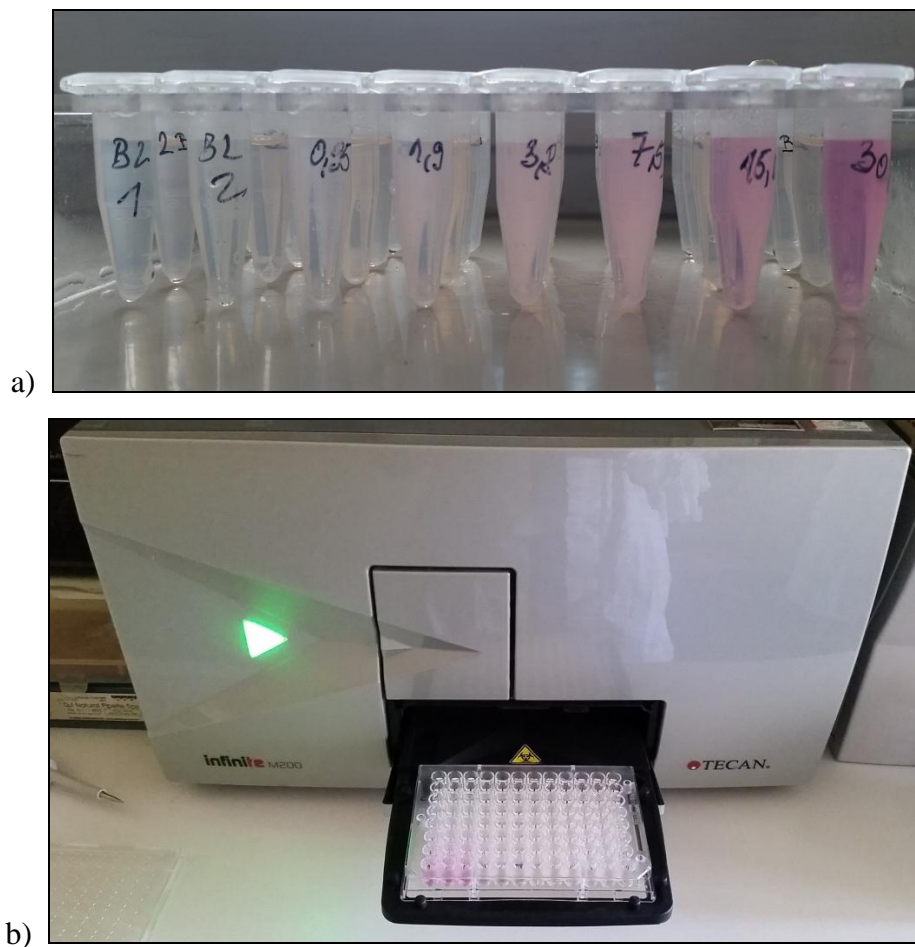
na 4 °C. Nakon centrifugiranja 250 µL supernatanta (S3) premješteno je u nove Eppendorf epruvete.

2. 200 µL BHT razrijeđeno je s 19,8 mL TCA (temeljna otopina BHT razrijeđena je 100 puta) te je 0,5 mL dodano u supernatant S3, promiješano na vrtložnoj miješalici MS1 (Ika-Works, Njemačka) oko 30 sekundi i stavljeno na led 15 minuta. Zatim su uzorci centrifugirani u Biofuge Fresco centrifugi (Kendro, SAD) pri $4000 \times g$ tijekom 15 minuta na 4 °C te je odvojeno 0,75 mL supernatanta. Supernatantu je dodano 0,5 mL TBA. Uzorak je promiješan na vrtložnoj miješalici oko 10 sekundi te je dobivenih 1,25 mL uzorka grijano u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 30 minuta. Uzorci su kratko stavljeni na led da se ohlade, a zatim su držani na sobnoj temperaturi.

3. Baždarni pravac određen je korištenjem 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP, Sigma-Aldrich, SAD). Svježe je priređena temeljna otopina 3,035 mM TEP otapanjem u 0,01 N HCl. U tikvici je pomiješano 37 µL TEP s 0,5 mL 1 N HCl te je tikvica dopunjena Milli Q vodom do 50 mL, začepljena i omotana parafilmom. Grijana je na 50 °C tijekom 60 minuta, a zatim ohlađena na sobnu temperaturu. Pri povišenoj temperaturi u kiselim uvjetima TEP hidrolizom prelazi u MDA. Niz koncentracija standarda MDA za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije MDA iz temeljne je otopine priređen u rasponu od 0,95-30,35 µM.

Slijepa proba (blank) napravljena je miješanjem 250 µL pufera s 0,5 mL TCA (u koju je dodana BHT u omjeru 1:100) i 0,5 mL TBA. Standardi su napravljeni miješanjem 250 µL otopine standarda određene koncentracije s 0,5 mL TCA (u koju je dodana BHT u omjeru 1:100) i 0,5 mL TBA.

Uzorcima (200 µL) je izmjerena apsorbancija na 535 nm (Slika 12) u fotometru Infinite M200 (Tecan, Švicarska). Iz kalibracijskog pravca napravljenog u programu Microsoft Excel određene su koncentracije MDA u analiziranim uzorcima. Rezultati su izraženi kao nanomoli MDA po gramu mokre mase tkiva.



Slika 12. Fotografije uzoraka za određivanje koncentracije MDA: a) u epruветama prije stavljanja u jažice mikroploče; b) u mikroploči u fotometru Infinite M200 neposredno prije očitavanja apsorbancije na 535 nm.

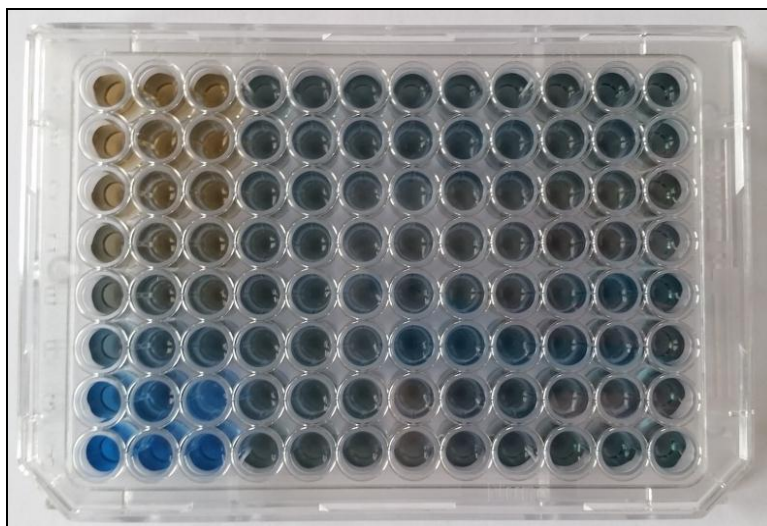
2.7.4. Kvantitativno određivanje ukupnog sadržaja proteina u citosolu

Koncentracija ukupnih proteina određivana je u izoliranoj citosolnoj frakciji (S50). Mjerenje ukupnog sadržaja proteina u vodotopivoj frakciji (citosolu) tkiva probavne žlijezde provedeno je kolorimetrijskom metodom prema Bradfordu (1976), prilagođenoj u Laboratoriju za biološke učinke metala za izvedbu u mikroploči.

Reakcija otopljenih proteina s reagensom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (Serva, Feinbiochemia, Njemačka) vodi do vezanja anionske boje za NH_3 skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa i pojavom apsorpcijskog maksimuma pri 595 nm (A_{595}). Kvantitativno određivanje proteina temeljeno na ovoj reakciji moguće je zbog linearne ovisnosti apsorbancije A_{595} o masi proteina u rastućem nizu standardnih otopina (albumin iz govedeg seruma; BSA-bovine serum albumine) (Serva, Feinbiochemia, Njemačka) kao i u

uzorcima, nakon primjene CBB reagensa (0,01 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 4,7 % etanol; 8,5 % H_3PO_4).

Iz osnovne otopine BSA (5 mg/mL) pripremljen je rastući niz od osam standardnih otopina BSA u rasponu od 0,0075-1,0 mg/mL, u istom puferu kao i uzorak. Volumen od 10 μ l pripremljenog standarda/uzorka dodan je u triplikatu u jažice na mikroploči, a zatim je u sve jažice dodano po 200 μ l CBB reagensa (Slika 13). Nakon dodavanja reagensa pločica je protresena tijekom 5 sekundi kako bi se uzorak i reagens pomiješali, a zatim je ostavljena stajati 5 minuta te je ponovno protresena, nakon čega je u fotometru za mikroploče Infinite M200 (Tecan, Švicarska) izmjerena apsorbanca na 595 nm. Neposredno prije analize citosol je razrijeđen s puferom za homogeniziranje kako bi uzorci bili ispod 0,5 mg/mL.



Slika 13. Standardi (prva tri stupca mikroploče) i uzorci (ostatak mikroploče) s dodatkom CBB reagensa prije mjerenja apsorbanca u fotometru na 595 nm.

2.8. Prikaz i obrada rezultata

Svi izračuni iz prikupljenih brojčanih podataka provedeni su u računalnom programu Microsoft Excel 2013. Rezultati mjerenja obrađeni su opisnim statističkim metodama (aritmetička sredina \pm SD), te prikazani slikovno ili u tablicama. Izrada grafičkih prikaza i statistička analiza podataka provedena je u računalnim programima Microsoft Excel 2013 i STATISTICA 8.0 za Microsoft Windows. Za usporedbu skupina korišten je t-test za nezavisne uzorke. Statistički značajna razlika uzeta je na razini 95 %-tne vjerojatnosti ($p < 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Koncentracije otopljenih metala i metaloida u vodi

U Tablici 1 prikazane su koncentracije ukupno otopljenih 26 elemenata u tragovima i 4 makroelementa izmjerene u uzorcima vode koji su uzeti u svibnju 2016. godine s dviju dubina u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m).

Na obje dubine, koncentracije Co, Cs, Bi, Sn, Ag, Pb, Ti i Cu bile su ispod granice detekcije primijenjene metode (LOD). Koncentracije Cd, Rb, Mo, Mn, Li, Fe, Sr, K i Na bile su značajno više u uzorcima vode s veće dubine (Tablica 1), dok se koncentracije preostalih elemenata nisu statistički značajno razlikovale s obzirom na dubinu uzorkovanja.

Tablica 1. Koncentracije otopljenih metala i metaloida ($\mu\text{g/L}$ za elemente u tragovima, mg/L za makroelemente; srednja vrijednost \pm S.D.) u uzorcima vode s dviju dubina u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Četiri makroelementa izdvojena su u donjem dijelu tablice. Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
Cs	<0,001	<0,001
Bi	<0,005	<0,005
Sn	<0,012	<0,012
Co	<0,019	<0,019
Ag	<0,064	<0,064
Pb	<0,071	<0,071
Ti	<0,120	<0,120
Cu	<0,401	<0,401
Cd	0,002 \pm 0,001	0,004 \pm 0,001*
Tl	0,005 \pm 0,000	0,005 \pm 0,000
Sb	0,029 \pm 0,005	0,029 \pm 0,003
Ni	0,063 \pm 0,011	0,108 \pm 0,070
As	0,131 \pm 0,040	0,155 \pm 0,008

Tablica 1. (nastavak):

Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
Se	0,291 ± 0,024	0,358 ± 0,037
Rb	0,309 ± 0,005	0,328 ± 0,006*
Cr	0,467 ± 0,060	0,559 ± 0,100
V	0,797 ± 0,032	0,804 ± 0,019
U	0,762 ± 0,019	0,739 ± 0,020
Mo	0,712 ± 0,023	0,782 ± 0,010*
Mn	0,558 ± 0,049	0,992 ± 0,036*
Li	0,982 ± 0,013	1,046 ± 0,016*
Al	1,227 ± 0,163	2,019 ± 1,071
Fe	1,555 ± 0,150	2,083 ± 0,065*
Zn	9,617 ± 2,061	7,207 ± 1,405
Ba	11,041 ± 1,348	10,302 ± 0,118
Sr	588,798 ± 6,994	657,088 ± 16,252*
K	0,483 ± 0,012	0,516 ± 0,014*
Na	2,364 ± 0,044	2,603 ± 0,137*
Mg	10,127 ± 0,243	10,762 ± 0,472
Ca	96,106 ± 0,328	102,199 ± 4,956

3.2. Školjkaši

3.2.1. Morfološki pokazatelji i indeksi

Podaci za srednje vrijednosti i raspone između najmanjih i najvećih vrijednosti osnovnih biometrijskih pokazatelja uzorkovanih školjkaša prikazani su u Tablici 2. Primjena t-testa pokazala je da postoji statistički značajna razlika između istraživanih dubina za duljinu školjke, ukupnu masu školjkaša i masu školjke, dok za indeks kondicije nije ustanovljena značajna razlika između dubina. Značajno dulje i teže školjke uzorkovane su u plićem (Visovac – površina) u odnosu na dublji dio Visovačkog jezera (Visovac – dno). Masa školjke

prati ukupnu masu školjkaša pa su tako školjkaši s plićeg lokaliteta imali i značajno teže školjke.

Tablica 2. Morfološki pokazatelji i indeksi (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) uzorkovanih školjkaša *A. exulcerata*. Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

	Visovac – površina	Visovac – dno
Duljina školjke / cm	8,7 \pm 0,6* (7,8-9,7)	6,8 \pm 0,3 (6,4-7,6)
Masa školjkaša / g	46,2 \pm 8,6* (33,7-59,0)	25,4 \pm 2,9 (20,2-31,1)
Masa školjke / g	13,1 \pm 2,5* (8,4-17,8)	8,0 \pm 0,7 (6,8-9,8)
Indeks kondicije / %	25,0 \pm 3,1 (19,3-30,2)	23,7 \pm 3,1 (18,3-29,7)

3.2.2. Ukupne koncentracije metala i metaloida u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata*

3.2.2.1. Ukupne koncentracije esencijalnih elemenata u tragovima

U Tablici 3 prikazane su ukupne koncentracije 8 esencijalnih elemenata u tragovima u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša.

Kao što se vidi iz tablice, od analiziranih esencijalnih elemenata, u najmanjim koncentracijama bili su prisutni Co, V, Mo i Se (<1 $\mu\text{g/g}$). Bakar je bio prisutan u koncentracijama od nekoliko $\mu\text{g/g}$ vlažne mase tkiva, dok su Zn, Mn i Fe bili prisutni u koncentracijama od nekoliko desetaka do nekoliko stotina $\mu\text{g/g}$ tkiva.

Statistički značajno više vrijednosti na dubokome u odnosu na plitki lokalitet zabilježene su za V, Se, Mn i Fe. Vrijednosti V i Se bile su umjereno (15-25 %), a Mn i Fe višestruko (5 puta) povišene na dubljem lokalitetu. Koncentracije Cu i Zn bile su značajno više (~2 puta) na površinskom lokalitetu, dok su Co i Mo bili prisutni u podjednakim koncentracijama na oba lokaliteta.

Usporedbom s koncentracijama metala u vodi (Tablica 1), isti trend porasta metala, tj. više razine na dubokome u odnosu na površinski lokalitet, nađen je za Mn i Fe.

Tablica 3. Ukupne koncentracije esencijalnih elemenata u tragovima ($\mu\text{g/g}$ tkiva; srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
V	0,107 \pm 0,019 (0,082-0,143)	0,132 \pm 0,020* (0,094-0,166)
Co	0,168 \pm 0,088 (0,083-0,400)	0,168 \pm 0,043 (0,134-0,256)
Mo	0,168 \pm 0,039 (0,127-0,261)	0,168 \pm 0,022 (0,114-0,195)
Se	0,612 \pm 0,098 (0,458-0,778)	0,701 \pm 0,078* (0,509-0,836)
Cu	8,1 \pm 4,7* (2,6-18,8)	4,3 \pm 0,9 (3,2-5,9)
Zn	52,4 \pm 34,9* (17,6-137,6)	25,7 \pm 3,7 (17,1-31,4)
Mn	110,7 \pm 32,7 (52,5-175,0)	549,7 \pm 178,1* (294,5-860,7)
Fe	141,0 \pm 40,2 (73,7-214,5)	720,2 \pm 283,2* (73,7-1145,0)

3.2.2.2. Ukupne koncentracije neesencijalnih elemenata u tragovima

U Tablici 4 prikazane su ukupne koncentracije 15 neesencijalnih elemenata u tragovima u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša.

Koncentracije ukupnog Cs, Sb i Bi nisu se značajno razlikovale između lokaliteta, a ovi su elementi ujedno bili i najmanje zastupljeni neesencijalni elementi u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata*. Podjednake koncentracije na oba lokaliteta utvrđene su također za Ag, Ti, Cd i Al. Sadržaj ukupnog Tl, Pb, Rb i Ni bio je značajno viši u školjkaša s površinske lokacije. Razlike su bile najizraženije u slučaju Tl čija je izmjerena srednja vrijednost na površinskoj lokaciji bila gotovo 10 puta viša nego na dubljoj lokaciji, dok su u slučaju Pb, Rb i Ni razlike bile manje i iznosile su ~80 % za Pb, 45 % za Rb te 30 % za Ni. Statistički značajno više vrijednosti na dubljem lokalitetu u odnosu na plići lokalitet utvrđene su za U, Cr, As, Ba i Sr. Najveće razlike ustanovljene su za Ba čije su prosječne vrijednosti na dubljem lokalitetu bile 6,3 puta više nego na površinskom lokalitetu te za Sr, kod kojeg je ta razlika iznosila 4,8 puta. Ba i Sr ujedno su bili i najviše zastupljeni neesencijalni elementi u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata*. Srednje vrijednosti ukupnog As bile su ~66 % više na dubljem lokalitetu. Razlike za U i Cr bile su manje izražene i iznosile su 37 % za U te 25 % za Cr.

Usporedbom s koncentracijama metala u vodi (Tablica 1), jedino se za Sr opaža isti trend porasta metala, tj. više razine metala na dubljem u odnosu na površinski lokalitet.

Tablica 4. Koncentracije neesencijalnih elemenata u tragovima ($\mu\text{g/g}$ tkiva; srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal/metaloid ($\mu\text{g/g}$)	Visovac – površina	Visovac – dno
Cs	0,001 \pm 0,000 (0,000-0,001)	0,001 \pm 0,000 (0,000-0,001)
Sb	0,004 \pm 0,001 (0,002-0,005)	0,004 \pm 0,000 (0,003-0,004)
Bi	0,005 \pm 0,002 (0,003-0,012)	0,005 \pm 0,001 (0,004-0,007)

Tablica 4. (nastavak):

Metal/metaloid ($\mu\text{g/g}$)	Visovac – površina	Visovac – dno
Tl	$0,039 \pm 0,038^*$ (0,005-0,139)	$0,004 \pm 0,001$ (0,002-0,005)
Ag	$0,068 \pm 0,076$ (0,010-0,316)	$0,045 \pm 0,020$ (0,024-0,087)
U	$0,035 \pm 0,001$ (0,019-0,057)	$0,048 \pm 0,011^*$ (0,025-0,062)
Ti	$0,140 \pm 0,057$ (0,089-0,318)	$0,113 \pm 0,031$ (0,078-0,164)
Pb	$0,215 \pm 0,111^*$ (0,095-0,493)	$0,122 \pm 0,022$ (0,093-0,162)
Cr	$0,293 \pm 0,078$ (0,176-0,427)	$0,366 \pm 0,108^*$ (0,253-0,588)
Ni	$0,290 \pm 0,076^*$ (0,207-0,494)	$0,219 \pm 0,029$ (0,179-0,280)
Rb	$0,441 \pm 0,047^*$ (0,379-0,568)	$0,304 \pm 0,020$ (0,263-0,348)
Cd	$0,660 \pm 0,500$ (0,133-1,835)	$0,374 \pm 0,057$ (0,273-0,447)
As	$0,783 \pm 0,095$ (0,608-0,945)	$1,3 \pm 0,1^*$ (1,1-1,5)
Al	$2,5 \pm 1,7$ (1,0-7,1)	$3,0 \pm 0,8$ (2,1-4,6)
Ba	$10,9 \pm 3,5$ (4,9-16,3)	$68,8 \pm 22,6^*$ (40,3-111,8)
Sr	$24,7 \pm 8,3$ (11,5-41,3)	$117,5 \pm 39,0^*$ (61,7-176,5)

3.2.2.3. Ukupne koncentracije makroelemenata

U Tablici 5 prikazane su ukupne koncentracije 4 makroelementa u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša.

Od analiziranih makroelemenata, najmanje koncentracije su zabilježene za Mg, dok su koncentracije Ca dosezale čak vrijednosti od nekoliko mg/g tkiva. Značajno više vrijednosti na dubokom lokalitetu u odnosu na plitki lokalitet zabilježene su za Mg i Ca. Vrijednosti Mg bile su umjereno (~30 %), a Ca višestruko (~4 puta) povišene na dubljem lokalitetu. Natrij je bio prisutan u podjednakim koncentracijama na oba lokaliteta, a sadržaj K bio je ~10 % viši na površinskom lokalitetu.

Usporedbom s koncentracijama makroelemenata u vodi (Tablica 1), opaža se da ukupne koncentracije niti jednog od 4 analizirana makroelemenata nisu pratile trend razlika između dubina koji je ustanovljen za njihove koncentracije u vodi.

Tablica 5. Ukupne koncentracije makroelemenata ($\mu\text{g/g}$ tkiva; srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
Mg	134,0 \pm 14,5 (117,9-160,3)	174,8 \pm 29,0* (114,8-221,6)
Na	177,8 \pm 24,4 (146,3-227,5)	180,6 \pm 14,7 (160,4-211,6)
K	389,3 \pm 47,2* (324,8-464,9)	353,9 \pm 43,5 (265,4-418,8)
Ca	1242,1 \pm 398,4 (660,3-2160,8)	5114,3 \pm 1739,1* (2695,0-8239,1)

3.2.3. Citosolne koncentracije metala i metaloida u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata*

3.2.3.1. Citosolne koncentracije esencijalnih elemenata u tragovima

U Tablici 6 prikazane su citosolne koncentracije esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša.

Kao što se vidi iz tablice, citosolne koncentracije Cu i Zn bile su značajno više (~20 %) u jedinkama s dubljeg lokaliteta, dok za preostalih šest esencijalnih elemenata nisu utvrđene značajne razlike s obzirom na dubinu uzorkovanja.

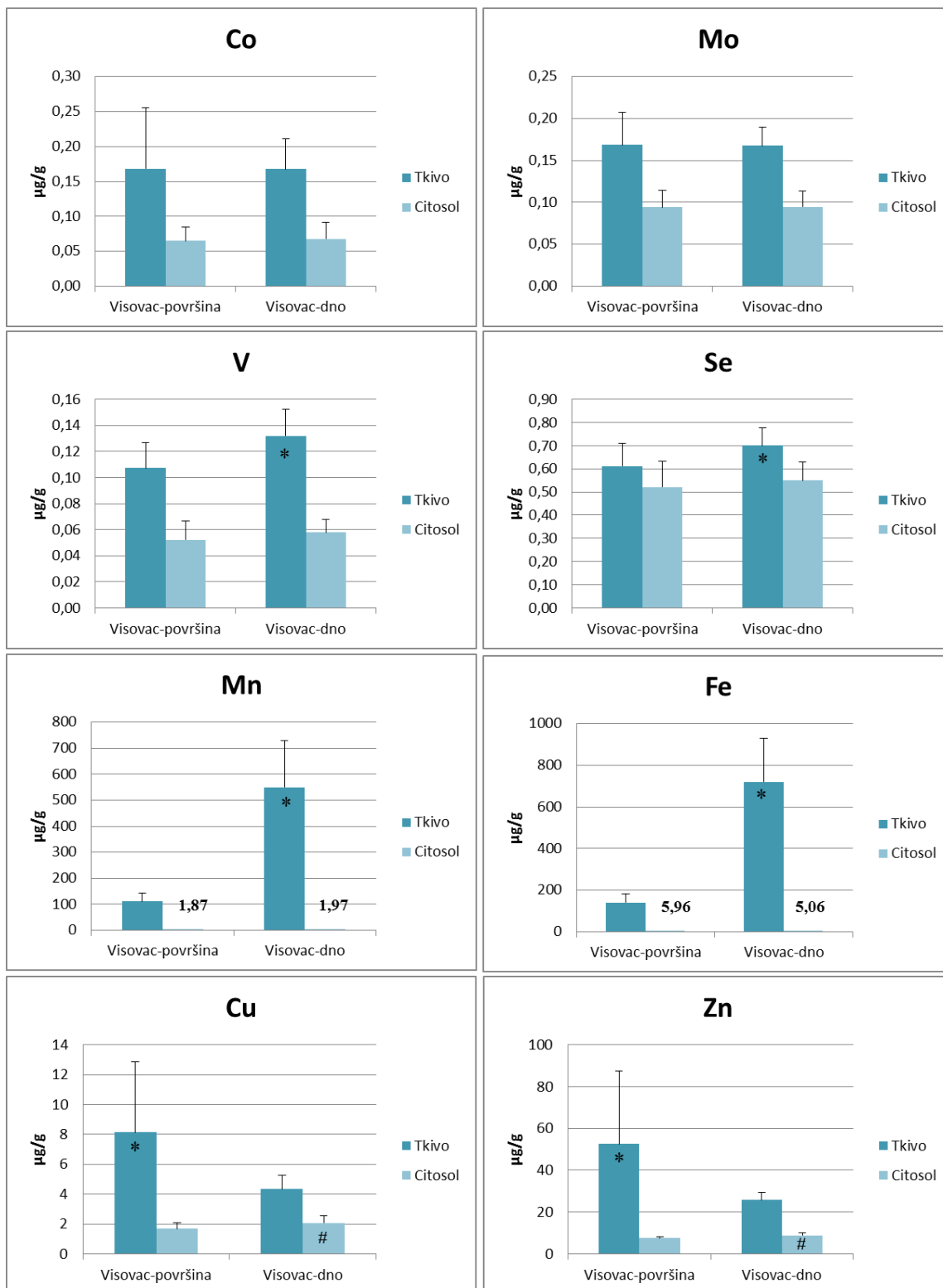
Na Slici 14 prikazane su usporedno ukupne i citosolne koncentracije esencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša, a u Tablici 7 navedeni su postotni udjeli citosolne frakcije metala u ukupnom tkivnom metalu.

Iz usporednih prikaza ukupnih i citosolnih koncentracija na Slici 14, uočava se da citosolne koncentracije Co i Mn slijede isti obrazac razlika među dubinama kao onaj od ukupnog metala. Nasuprot tome, citosolne koncentracije V, Se, Mn, Fe, Cu i Zn nisu slijedile obrazac ponašanja ukupnih metala. Stoga su citosolne koncentracije V, Se, Mn i Fe bile usporedive na obje dubine, dok su njihove ukupne koncentracije u tkivu bile značajno više na dubljem lokalitetu. Također, dok je ukupni sadržaj Cu i Zn u tkivu probavne žlijezde bio značajno povišen na površinskom lokalitetu, njihov sadržaj u citosolnoj frakciji bio je značajno viši u jedinkama s dubljeg lokaliteta.

Iz tablice 7, vidljivo je da je od svih analiziranih esencijalnih elemenata Se bio zastupljen s najvećim postotkom (~80-85 %) u topljivoj frakciji tkiva probavne žlijezde. Iza njega slijede Mo s ~55 %, V i Co s 40-45 %, Cu i Zn s 20-50 % te Fe i Mn s prosječnom zastupljenošću <5 %. Statistički značajne razlike u postotnoj zastupljenosti citosolnih metala u ukupnom tkivnom metalu između lokaliteta ustanovljene su za Se, Mn i Fe, čiji su prosječni udjeli u citosolnoj frakciji bili viši na površinskom lokalitetu, te za Cu i Zn, s prosječno višim udjelima na dubljem lokalitetu. Usporede li se prosječni udjeli V, Se, Mn, Fe, Cu i Zn u citosolnoj frakciji (Tablica 6) s njihovim ukupnim količinama u tkivu probavne žlijezde (Tablica 3 i Slika 14) opaža se da s porastom sadržaja pojedinog metala u tkivu opada njegov udio u citosolnoj frakciji.

Tablica 6. Citosolne koncentracije esencijalnih elemenata u tragovima izražene u $\mu\text{g/g}$ tkiva (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvije dubine u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
V	$0,052 \pm 0,015$ (0,025-0,079)	$0,058 \pm 0,01$ (0,037-0,072)
Co	$0,065 \pm 0,019$ (0,042-0,129)	$0,068 \pm 0,023$ (0,042-0,112)
Mo	$0,094 \pm 0,021$ (0,06-0,136)	$0,094 \pm 0,019$ (0,052-0,123)
Se	$0,521 \pm 0,112$ (0,334-0,789)	$0,549 \pm 0,079$ (0,381-0,682)
Cu	$1,68 \pm 0,38$ (0,97-2,45)	$2,07 \pm 0,48^*$ (1,22-3,04)
Mn	$1,87 \pm 0,27$ (1,48-2,29)	$1,97 \pm 0,25$ (1,66-2,46)
Fe	$5,96 \pm 1,31$ (3,26-8,35)	$5,06 \pm 1,3$ (3,52-7,85)
Zn	$7,41 \pm 0,87$ (5,74-8,59)	$8,83 \pm 1,18^*$ (6,98-10,55)



Slika 14. Usporedni prikaz ukupnih i citosolnih koncentracija esencijalnih elemenata u tragovima (srednja vrijednost \pm S.D) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$, t-test za nezavisne uzorke) između dubina označene su za ukupne metale zvjezdicom (*), a za citosolne znakom „ljestvi“ (#).

Tablica 7. Postotna zastupljenost citosolnih esencijalnih elemenata u tragovima (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvije dubine u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Citosolni metal/metaloid (% u ukupnom metalu)	Visovac – površina	Visovac – dno
Se	84,8 \pm 9,3* (64,9-101,1)	78,3 \pm 5,3 (65,4-86,3)
Mo	56,7 \pm 10,7 (36,3-74,4)	56,0 \pm 5,8 (45,7-63,1)
V	48,0 \pm 8,3 (30,7-60,3)	43,9 \pm 5,2 (36,2-52,0)
Co	43,0 \pm 10,4 (13,6-60,0)	39,8 \pm 5,1 (30,8-45,6)
Cu	29,6 \pm 18,8 (6,5-59,5)	49,4 \pm 13,5* (30,6-72,7)
Zn	21,1 \pm 13,8 (4,2-45,7)	35,2 \pm 4,2* (28,1-41,3)
Mn	1,8 \pm 0,6* (1,0-3,3)	0,4 \pm 0,1 (0,3-0,6)
Fe	4,6 \pm 1,5* (1,6-6,3)	0,8 \pm 0,2 (0,4-1,2)

3.2.3.2. Citosolne koncentracije neesencijalnih elemenata u tragovima

U Tablici 8 prikazane su citosolne koncentracije neesencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša.

Kao što se vidi iz tablice, koncentracije Ti, Rb, Pb i Ni bile su značajno više u citosolima probavnih žlijezda jedinki s površinskog lokaliteta, pri čemu su u slučaju Ti i Rb prosječne izmjerene vrijednosti na površinskom lokalitetu bile više za ~50 %, a u slučaju Pb i Ni za ~30 %. Značajno više vrijednosti na dubokome u odnosu na plitki lokalitet zabilježene su za Ag,

As, Cd, Tl, Bi i U. Razlike su bile najizraženije u slučaju Ag čija je prosječna vrijednost na dubljoj lokaciji bila gotovo 3 puta viša nego na plićoj, dok su u slučaju As, Cd, Tl, Bi i U razlike bile manje i iznosile su ~50 % za As, Cd i Tl te ~30 % za Bi i U. Za preostale analizirane neesencijalne elemente nisu ustanovljene značajne razlike u citosolnim koncentracijama s obzirom na dubinu uzorkovanja.

Tablica 8. Citosolne koncentracije neesencijalnih elemenata u tragovima izražene u $\mu\text{g/g}$ tkiva (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
Cs	0,0004 \pm 0,0001 (0,0003-0,008)	0,004 \pm 0,0001 (0,0003-0,0006)
Tl	0,0004 \pm 0,0002 (0,0002-0,0009)	0,0006 \pm 0,0001* (0,0004-0,0008)
Sb	0,0017 \pm 0,0003 (0,001-0,0023)	0,0018 \pm 0,0003 (0,0015-0,0024)
Bi	0,0019 \pm 0,0006 (0,001-0,003)	0,0025 \pm 0,0004* (0,0019-0,0032)
Ag	0,0025 \pm 0,0005 (0,0016-0,0032)	0,0071 \pm 0,0016* (0,0055-0,0101)
U	0,013 \pm 0,004 (0,006-0,021)	0,017 \pm 0,004* (0,009-0,022)
Ti	0,036 \pm 0,01* (0,018-0,056)	0,024 \pm 0,004 (0,017-0,029)
Cr	0,056 \pm 0,016 (0,037-0,087)	0,046 \pm 0,011 (0,027-0,062)
Pb	0,057 \pm 0,012* (0,032-0,076)	0,044 \pm 0,008 (0,035-0,062)

Tablica 8. (nastavak):

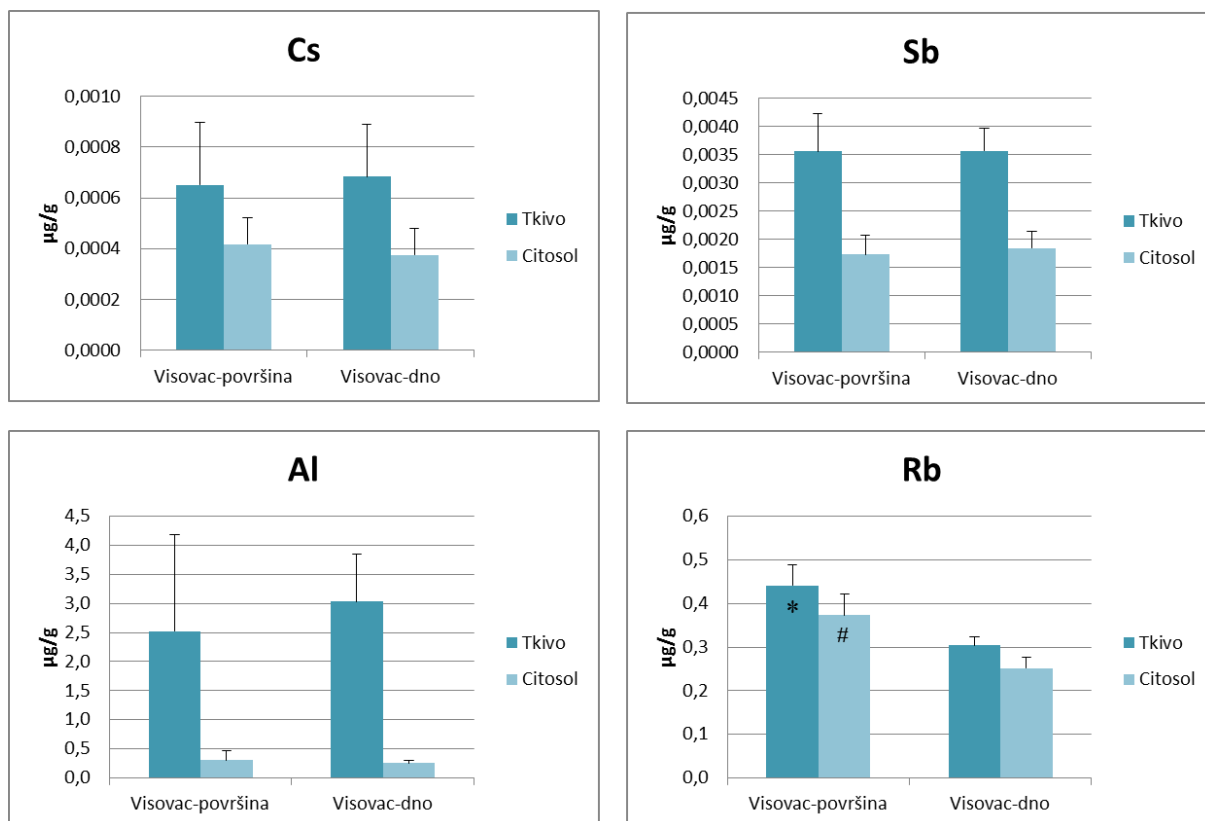
Metal/metaloid	Visovac – površina	Visovac – dno
Ni	0,087 ± 0,021* (0,053-0,12)	0,067 ± 0,014 (0,027-0,062)
Cd	0,193 ± 0,067 (0,104-0,346)	0,292 ± 0,049* (0,233-0,4)
Al	0,305 ± 0,155 (0,143-0,668)	0,25 ± 0,046 (0,183-0,321)
Rb	0,373 ± 0,049* (0,314-0,528)	0,252 ± 0,024 (0,202-0,299)
Ba	0,367 ± 0,064 (0,288-0,56)	0,386 ± 0,52 (40,3-111,8)
Sr	0,394 ± 0,065 (0,301-0,57)	0,405 ± 0,077 (0,313-0,586)
As	0,439 ± 0,059 (0,339-0,521)	0,675 ± 0,064* (0,552-0,766)

Na Slici 15a, 15b i 15c prikazane su usporedno ukupne i citosolne koncentracije analiziranih neesencijalnih elemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša, a u Tablici 9 navedeni su postotni udjeli citosolne frakcije metala u ukupnom metalu.

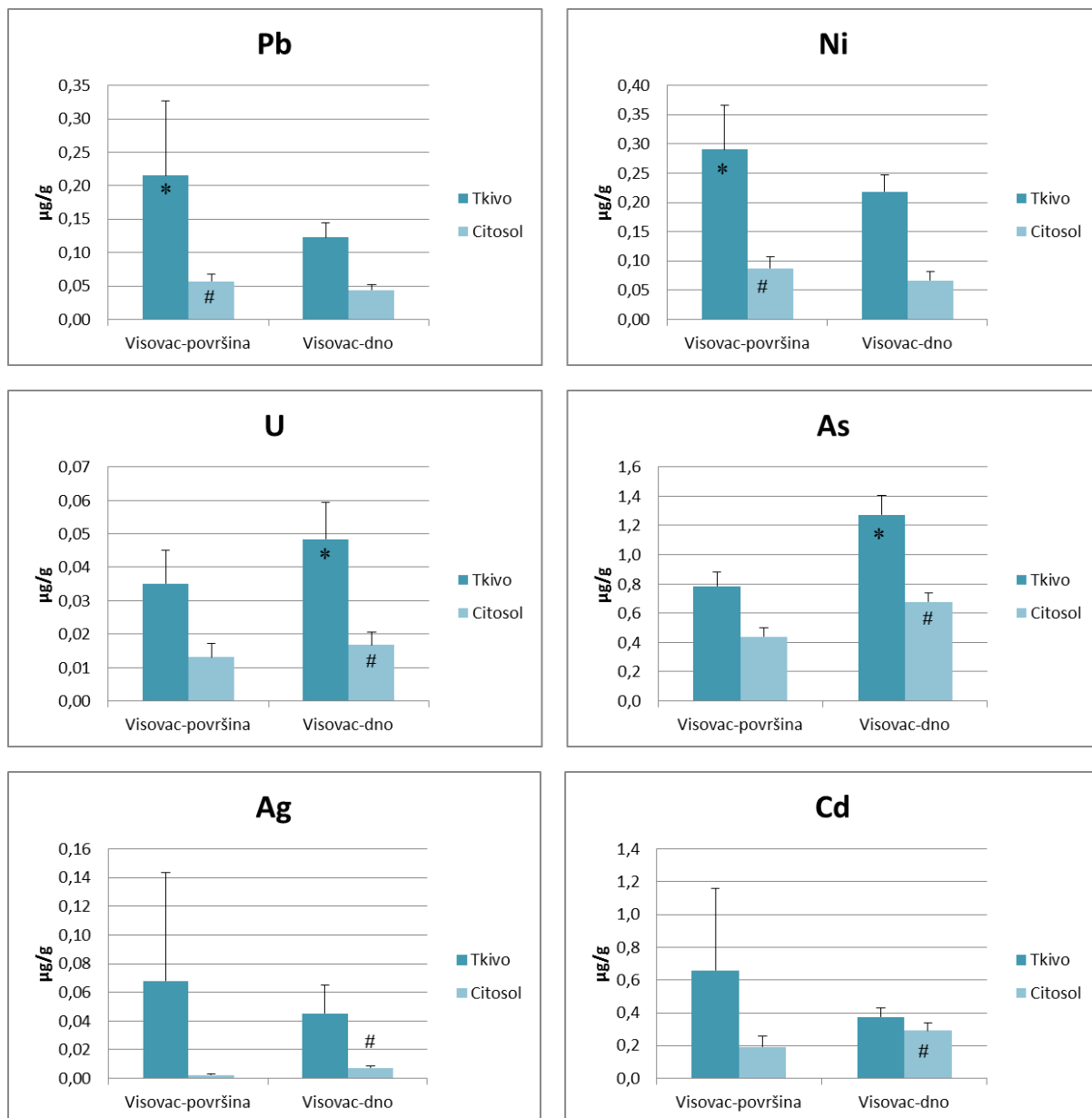
S obzirom na odnose koncentracija ukupnog i citosolnog metala na lokalitetima uzorkovanja, analizirane elemente možemo svrstati u sljedeće skupine:

1. elementi čije su i ukupne i citosolne koncentracije usporedive na oba lokaliteta - Cs, Sb i Al
2. elementi kod kojih značajno više vrijednosti ukupnog metala u tkivu prati značajno viša razina metala u citosolnoj frakciji tkiva
 - značajno viša razina na Visovac – površina: Rb, Pb i Ni
 - značajno viša razina na Visovac – dno: As i U
3. elementi kod kojih značajno više vrijednosti ukupnog metala rezultiraju usporedivim koncentracijama u citosolnoj frakciji tkiva – Cr, Ba i Sr

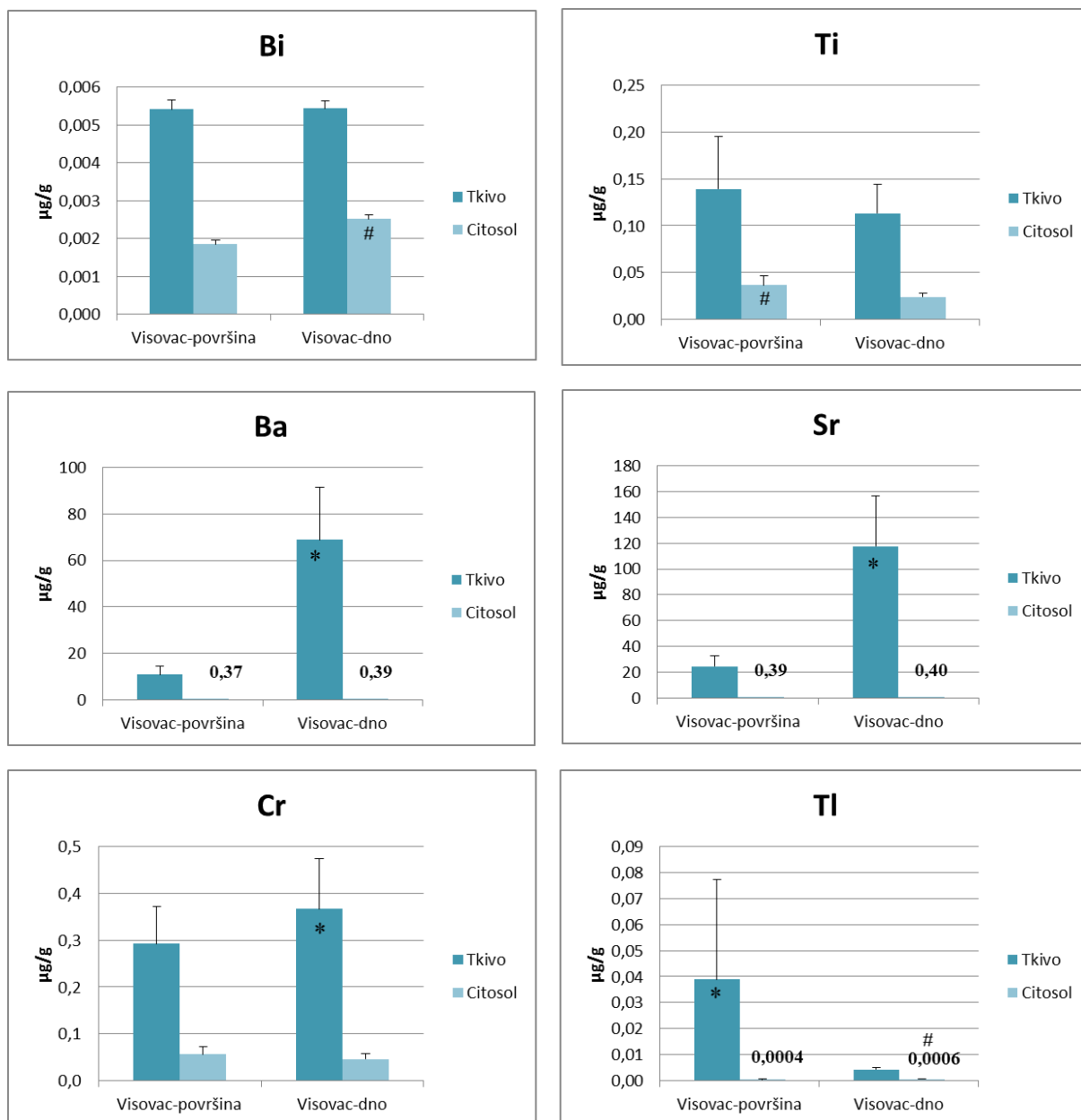
4. elementi kod kojih značajno više vrijednosti ukupnog metala u tkivu rezultiraju značajno manjim koncentracijama u citosolnoj frakciji tkiva - Tl
5. elementi čije su vrijednosti ukupnog metala u tkivu usporedive na oba lokaliteta, a koncentracije u citosolnoj frakciji se značajno razlikuju između lokaliteta
 - značajno više citosolne koncentracije na Visovac – površina – Ti
 - značajno više citosolne koncentracije na Visovac – dno – Bi, Ag i Cd



Slika 15a. Usporedni prikaz ukupnih i citosolnih koncentracija neesencijalnih elemenata u tragovima Cs, Sb, Al, Rb (srednja vrijednost \pm S.D) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$, t-test za nezavisne uzorke) između dubina označene su za ukupne metale zvjezdicom (*), a za citosolne znakom „ljestvi“ (#).



Slika 15b. Usporedni prikaz ukupnih i citosolnih koncentracija neesencijalnih elemenata u tragovima Pb, Ni, U, As, Ag, Cd (srednja vrijednost \pm S.D) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$, t-test za nezavisne uzorke) između dubina označene su za ukupne metale zvjezdicom (*), a za citosolne znakom „ljestvi“ (#).



Slika 15c. Usporedni prikaz ukupnih i citosolnih koncentracija neesencijalnih elemenata u tragovima Bi, Ti, Ba, Sr, Cr; Tl (srednja vrijednost \pm S.D) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$, t-test za nezavisne uzorke) između dubina označene su za ukupne metale zvjezdicom (*), a za citosolne znakom „ljestvi“ (#).

Prema postotnoj zastupljenosti citosolnog metala u ukupnom metalu (Tablica 9), s približno 50 % i većom zastupljenošću u citosolnoj frakciji bili su prisutni Rb, Cs, As i Sb na površinskom lokalitetu, a na dubokome Rb, Cd, Cs, As i Sb. Prosječni udio citosolnog Cd bio je značajno niži (~2 puta) na površinskom lokalitetu, dok je udio citosolnog Cs na ovom

lokalitetu bio značajno povišen. Postotnu zastupljenost u citosolnoj frakciji ~20-50 % imali su Bi, U, Pb, Ni i Ti na oba lokaliteta te Cr na površinskom lokalitetu. Prosječni udio citosolnog Bi bio je značajno viši na dubljem lokalitetu (~28 %), dok je prosječni udio citosolnog Cr bio ~46 % viši na površinskom lokalitetu. Aluminijski, Ag, Tl na oba lokaliteta te Cr na dubokom lokalitetu bili su prisutni u citosolnoj frakciji s manje od 20 %. Od analiziranih neesencijalnih elemenata, Ba i Sr su imali najmanju postotnu zastupljenost u citosolnoj frakciji probavne žlijezde (<5 %). S obzirom na razlike u udjelima između lokaliteta, Al, Ba i Sr imali su značajno veće udjele u školjkaša s pliće lokaliteta, dok su udjeli Ag i Tl bili veći u školjkaša s dubljeg lokaliteta.

Usporedbom trenda promjena u postotnoj zastupljenosti citosolne frakcije metala (Tablica 9) s povećanjem količine ukupno akumuliranog metala u tkivu (Tablica 8 i Slika 15a, 15b i 15c), opaža se da s porastom ukupnog metala kod Cd, Ag, Tl, Cs, Cr, Al, Ba i Sr dolazi do značajnog pada udjela citosolne frakcije metala, dok kod Rb, Pb, Ni, U i As nije ustanovljena značajna promjena udjela s porastom ukupnog metala.

Tablica 9. Postotna zastupljenost citosolnih neesencijalnih elemenata (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Citosolni metal/metaloid (% u ukupnom metalu)	Visovac – površina	Visovac – dno
Rb	84,6 \pm 7,0 (63,7-90,0)	82,4 \pm 5,0 (68,8-86,0)
Cd	40,4 \pm 19,8 (13,8-78,4)	78,4 \pm 6,9* (69,1-93,4)
Cs	67,5 \pm 13,3* (36,1-85,0)	55,8 \pm 5,8 (45,8-63,6)
As	56,4 \pm 5,7 (42,6-64,0)	52,8 \pm 4,0 (45,7-59,6)
Sb	48,8 \pm 5,5 (36,4-55,6)	52,2 \pm 5,9 (45,6-63,4)

Tablica 9. (nastavak):

Citosolni metal/metaloid (% u ukupnom metalu)	Visovac – površina	Visovac – dno
Bi	36,3 ± 9,5 (18,6-51,2)	46,3 ± 3,4* (41,7-51,9)
U	37,0 ± 4,9 (29,3-43,4)	34,9 ± 3,0 (31,0-41,3)
Pb	33,0 ± 16,8 (10,5-61,2)	36,9 ± 3,3 (31,2-40,9)
Ni	31,1 ± 8,3 (17,4-44,0)	31,5 ± 6,8 (22,8-46,2)
Ti	27,5 ± 6,9 (16,5-40,2)	22,6 ± 6,0 (14,8-31,9)
Cr	20,3 ± 7,6* (12,9-43,1)	13,9 ± 4,7 (9,6-24,5)
Al	14,4 ± 6,6* (3,8-26,4)	8,6 ± 1,4 (6,7-11,3)
Ag	8,3 ± 7,2 (0,9-22,9)	18,2 ± 5,6* (7,9-26,3)
Tl	3,4 ± 4,4 (0,1-11,9)	14,0 ± 2,4* (10,8-18,5)
Ba	3,9 ± 1,9* (2,1-8,0)	0,6 ± 0,2 (0,4-1,1)
Sr	1,8 ± 0,6* (0,9-3,6)	0,4 ± 0,1 (0,3-0,5)

3.2.3.3. Citosolne koncentracije makroelemenata

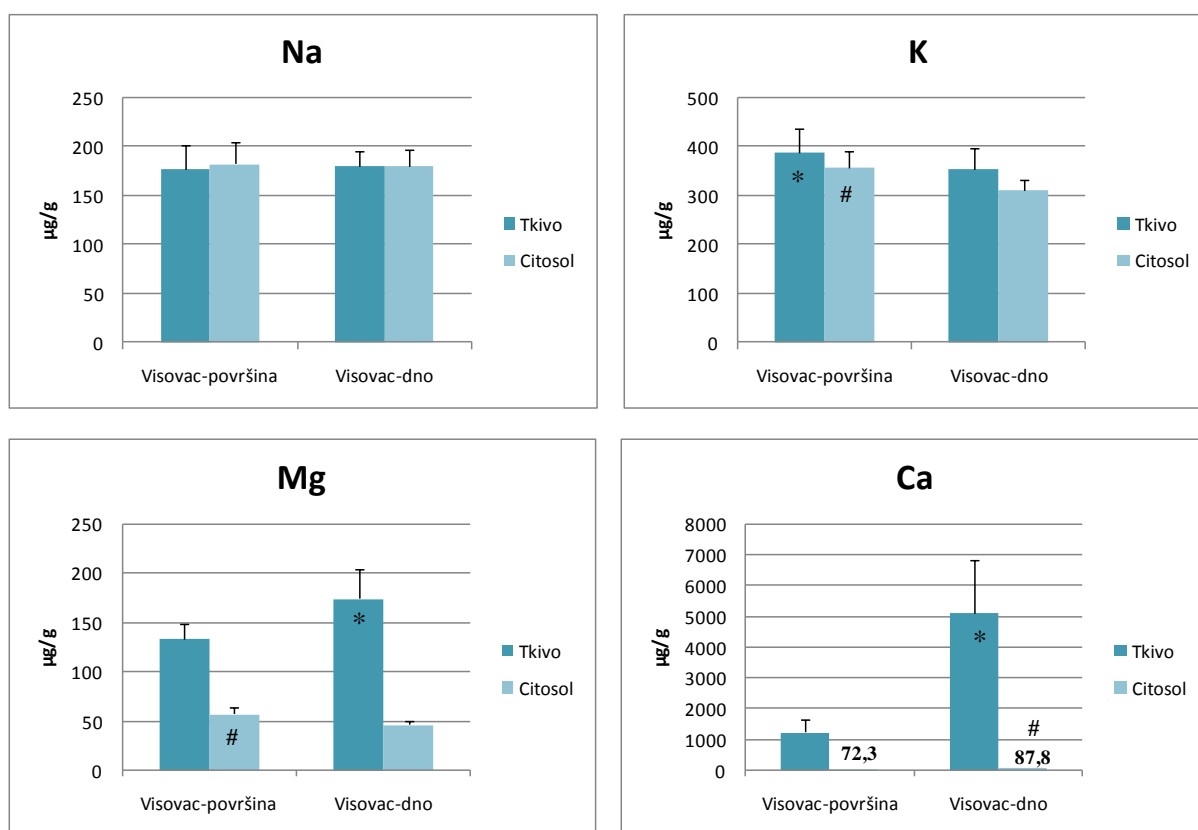
U Tablici 10 prikazane su citosolne koncentracije 4 makroelemenata u probavnoj žlijezdi uzorkovanih školjkaša.

Od analiziranih makroelemenata, na oba lokaliteta, najveće citosolne koncentracije zabilježene su za K, a za njim slijede u padajućem nizu Na, Ca i Mg. K i Mg bili su prisutni u značajno višim koncentracijama u citosolima probavnih žlijezda jedinki s površinske lokacije, dok je Ca bio značajno povišen kod jedinki s dubljeg lokaliteta. Citosolne koncentracije Na nisu se značajno razlikovale s obzirom na dubinu uzorkovanja.

Iz usporednih prikaza ukupnih i citosolnih koncentracija na Slici 16 opaža se da su izmjerene koncentracije i ukupnog i citosolnog Na bile usporedive na oba lokaliteta. Citosolne koncentracije K i Ca slijedile su obrazac ponašanja ukupnog metala, tj. i ukupne i citosolne koncentracije pojedinog metala bile su značajno povišene na istom lokalitetu (K na Visovac – površina, a Ca na Visovac – dno). Nasuprot tome, citosolne koncentracije Mg nisu slijedile obrazac ponašanja ukupnih metala pa je tako sadržaj Mg u citosolnoj frakciji bio značajno viši u jedinki s površinskog lokaliteta dok je njegov ukupni sadržaj bio značajno viši u jedinki s dubokoga lokaliteta.

Tablica 10. Citosolne koncentracije makroelemenata izražene u $\mu\text{g/g}$ tkiva (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

Metal	Visovac – površina	Visovac – dno
K	$357,7 \pm 33,4^*$ (296,5-407,2)	$311,8 \pm 22,3$ (283,0-365,5)
Na	$182,9 \pm 21,7$ (150,6-227,3)	$180,4 \pm 16,3$ (161,3-210,8)
Ca	$72,3 \pm 8,1$ (35,1-89,3)	$87,8 \pm 12,3^*$ (72,2-114,3)
Mg	$57,7 \pm 6,4^*$ (46,8-72,5)	$46,8 \pm 3,9$ (41,7-51,6)



Slika 16. Usporedni prikaz ukupnih i citosolnih koncentracija makroelemenata (srednja vrijednost \pm S.D) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$, t-test za nezavisne uzorke) između dubina označene su za ukupne metale zvjezdicom (*), a za citosolne znakom „ljestvi“ (#).

Prema visini postotnog udjela citosolnog metala u ukupnom metalu (Tablica 11), analizirane makroelemente možemo poredati u sljedećem opadajućem nizu: Na > K > Mg > Ca. Prosječni udjeli Mg i Ca bili su značajno povišeni u jedinki s dubljeg lokaliteta, dok za Na i K nisu ustanovljene značajne razlike u postotnoj zastupljenosti s obzirom na dubinu uzorkovanja.

Usporedbom trendova promjena postotne zastupljenosti citosolne frakcije pojedinog metala (Tablica 11) s povećanjem njegove akumulacije u tkivu (Tablica 5 i Slika 16), opaža se da s porastom ukupne količine metala u slučaju Ca i Mg dolazi do značajnog pada udjela citosolne frakcije metala, dok u slučaju K, porast akumulacije nije uzrokovao značajne promjene u raspodjeli K između topljive (citosolne) i netopljive frakcije tkiva.

Tablica 11. Postotna zastupljenost citosolnih makroelemenata (srednja vrijednost \pm S.D, raspon min-max) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvije dubine u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

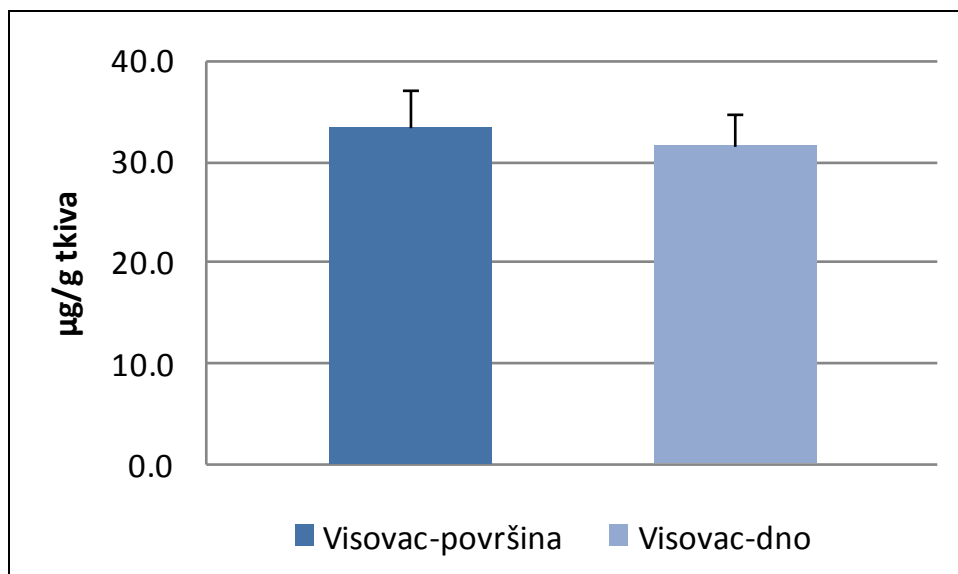
Citosolni metal/metaloid (% u ukupnom metalu)	Visovac – površina	Visovac – dno
Na	103,1 \pm 4,5 (98,3-117,5)	100,4 \pm 5,4 (91,1-109,1)
K	92,3 \pm 5,2 (83,7-101,9)	89,1 \pm 8,5 (80,9-106,6)
Mg	43,1 \pm 3,4* (36,4-50,1)	28,0 \pm 4,5 (21,5-38,5)
Ca	6,2 \pm 1,5* (4,0-9,4)	1,9 \pm 0,5 (1,4-2,9)

3.2.4. Biomarkeri

3.2.4.1. Koncentracija proteina

Koncentracije proteina u citosolnoj frakciji probavne žlijezde školjkaša uzorkovanih na dvije dubine Visovačkog jezera prikazane su na Slici 17.

Kao što se može vidjeti na slici, nešto više koncentracije citosolnih proteina utvrđene su u školjkaša s površinske lokacije, ali razlika nije bila statistički značajna.



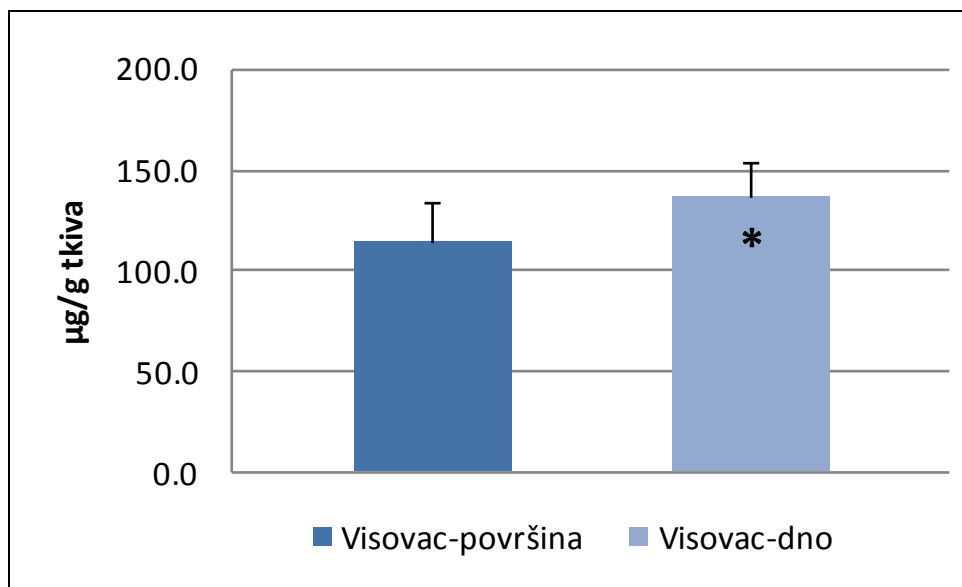
Slika 17. Koncentracija proteina u citosolnoj frakciji probavne žlijezde školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m).

3.2.4.2. Koncentracija metalotioneina

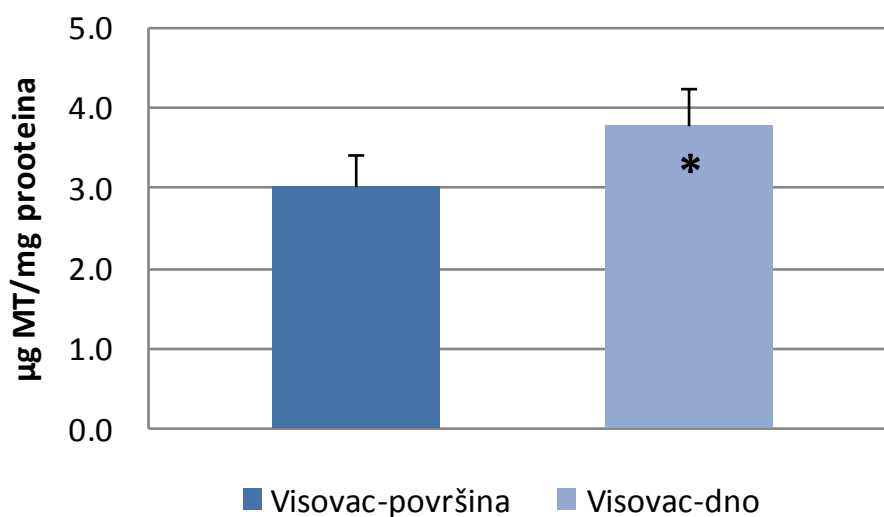
Na Slici 18 prikazane su koncentracije MT u citosolnoj frakciji probavne žlijezde uzorkovanih školjkaša izražene po mokroj masi tkiva, a na Slici 19 prikazan je sadržaj MT izražen na citosolne proteine.

Primjena t-testa pokazala je da bez obzira na način izražavanja postoji statistički značajna razlika u sadržaju MT s obzirom na dubinu uzorkovanja, odnosno u oba slučaja značajno više vrijednosti MT (~20 %) ustanovljene su u školjkaša s dubljeg lokaliteta.

Kako bi se utvrdila međusobna povezanost sadržaja MT sa sadržajem metala i metaloida u citosolnoj frakciji provedena je Pearsonova korelacijska analiza. Sadržaj MT izražen po mokroj masi tkiva pokazao je pozitivnu (porast koncentracije MT praćen je porastom koncentracije metala/metaloida u citosolnoj frakciji) i statistički značajnu korelaciju sa Se ($r = 0,53$), Ag ($r = 0,42$), Bi ($r = 0,49$), U ($r = 0,65$), V ($r = 0,63$), Cu ($r = 0,56$), Zn ($r = 0,66$), As ($r = 0,52$) i Tl ($r = 0,58$).



Slika 18. Koncentracija metalotioneina (MT) izražena po mokroj masi tkiva u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

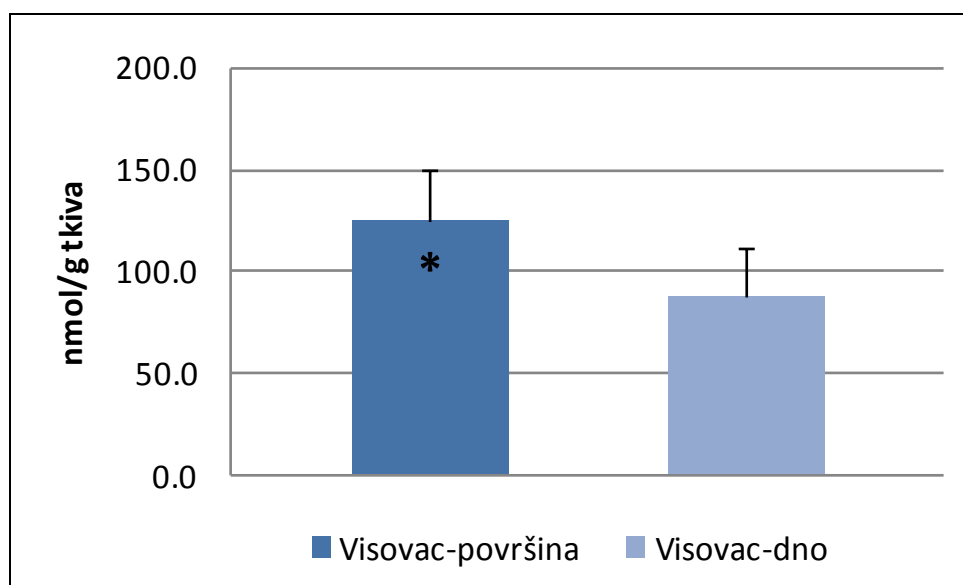


Slika 19. Sadržaj metalotioneina (MT) izražen na citosolne proteine u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

3.2.4.3. Koncentracija ukupnog glutationa

Na Slici 20 prikazane su koncentracije GSH izražene u nmol/g mokre mase tkiva u probavnoj žlijezdi školjkaša uzorkovanih na dvije dubine u Visovačkom jezeru.

Statistički značajno više vrijednosti ukupnog GSH (~40 %) izmjerene su u probavnoj žlijezdi školjkaša s površinskog lokaliteta. Od analiziranih elemenata u tragovima u citosolnoj frakciji probavne žlijezde, jedino je Rb pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju s GSH ($r = 0,52$).

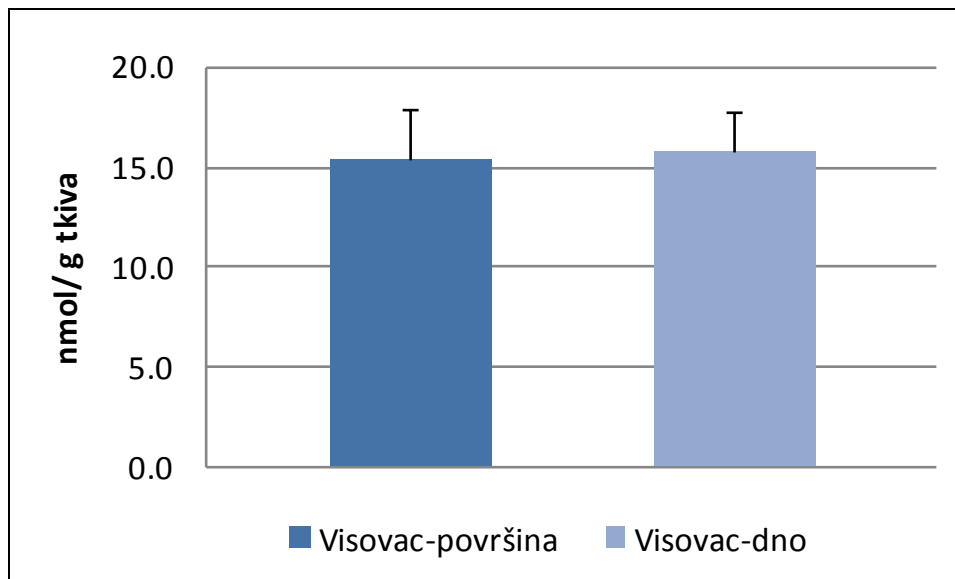


Slika 20. Koncentracija glutationa (GSH) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m). Vrijednosti označene zvjezdicom (*) razlikuju se statistički značajno na razini $p < 0,05$ prema t-testu za nezavisne uzorke.

3.2.4.4. Koncentracija malondialdehida

Koncentracije malondialdehida (MDA) u S3 frakciji probavne žlijezde uzorkovanih školjkaša prikazane su na Slici 21.

Nije ustanovljena statistički značajna razlika u sadržaju MDA s obzirom na dubinu uzorkovanja školjkaša.



Slika 21. Koncentracija malondialdehida (MDA) u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. exulcerata* uzorkovanih na dvjema dubinama u Visovačkom jezeru, Visovac – površina (1 – 3 m) i Visovac – dno (~13 m).

4. RASPRAVA

4.1. Bioraspoloživost metala na različitim dubinama jezera

4.1.1. Voda

Prirodnim procesima metali dolaze u atmosferu, litosferu i hidrosferu. Metali uneseni na taj način nalaze se u okolišu u svojim prirodnim koncentracijama, koje se razlikuju od područja do područja. U vodenim ekosustavima prirodne koncentracije metala uglavnom ovise o geologiji područja, tipu stijena i tla. Ljudske aktivnosti doprinose povećanju koncentracije metala u okolišu te takav dodatan unos metala može voditi do znatno većih koncentracija od prirodnih, što predstavlja opasnost za biotu. Vodeni sustavi su, zbog većeg broja trofičkih razina, mnogo osjetljiviji na povišene koncentracije ekotoksičnih metala nego kopneni sustavi (Mlakar i Kwokal, 2007). Posebno su osjetljivi krški vodeni sustavi, u kojima je prirodna koncentracija metala vrlo niska, zbog čega čak i mali dodatak metala antropogenom aktivnošću predstavlja prijetnju ekosustavu (Cukrov i sur., 2008).

Budući da prirodne koncentracije metala u vodi ovise o karakteristikama područja u kojem se nalaze, prije svake procjene kakvoće vode potrebno je znati prirodnu razinu metala u tragovima. Raspon prirodnih koncentracija metala u tragovima kreće se od nekoliko mikrograma do manje od 1 nanograma po litri. Metali u tragovima, prisutni u prirodnim koncentracijama, sudjeluju u nizu biokemijskih procesa, no u povišenim koncentracijama mogu postati toksični. Ekotoksični metali (Hg, Cd, Pb, Zn, Cu) otopljeni u vrlo niskim koncentracijama imaju toksičan učinak na živi svijet (Cukrov, 2008).

Prema Uredbi o klasifikaciji voda (NN 77/98), kao jedan od pokazatelja kakvoće vode navedene su koncentracije ekotoksičnih metala. Ekotoksični metali pokazatelji kakvoće vode su bakar, cink, kadmij, krom, nikal, olovo te živa, koja jedina nije mjerena u ovom radu. Prema graničnim koncentracijskim vrijednostima ekotoksičnih metala utvrđeno je pet vrsta kakvoće vode u kategorijama od I do V. S obzirom na koncentracije svih u ovom istraživanju izmjerenih ekotoksičnih metala u vodi Visovačkog jezera, kakvoća vode spada u kategoriju I vrste, tj. može se kategorizirati kao čista i nezagađena metalima.

Uredba o opasnim tvarima u vodama (NN 78/98) navodi dvije skupine opasnih tvari, A i B. U skupinu A uvrštene su „opasne tvari za koje je dokazano da su rizične za vodni okoliš i čovjeka i za koje se određuju najveće dopuštene koncentracije u vodnim sustavima, odnosno

zabranjuje njihovo ispuštanje u vode“. U skupini A se nalaze živa i njezini spojevi, kadmij i njegovi spojevi te olovo i njegovi spojevi, određeni također Okvirnom direktivom o vodama (direktiva 2008/105/EZ). U skupinu B pripadaju „opasne tvari za koje je dokazano da imaju nepoželjno djelovanje na vodni okoliš, odnosno na okus ili miris proizvoda koji služe za ljudsku ishranu, dobivenih iz prirodnih voda i za koje treba odrediti dopuštene koncentracije u vodnim sustavima, odnosno propisati uvjete za njihovo ispuštanje i uporabu“. To su, između ostaloga, Sb, As, Cu, Ba, Zn, Co, Sn, Cr, Mo, Ni, Se, Ag, Tl, Ti, U i V, koji su mjereni u ovom istraživanju. Izmjerene koncentracije svih navedenih elemenata nalaze se unutar graničnih vrijednosti kategorije I vrste kakvoće kopnenih voda.

Izmjerene koncentracije metala u tragovima u ovom radu uspoređene su s rezultatima rada Cukrov i sur. (2008). Koncentracija Cd u Visovačkom jezeru u oba istraživanja iznosila je oko 4 ng/L. Izmjerena koncentracija Zn u ovom radu veća je 17 puta na površini, odnosno 13 puta pri dnu Visovačkog jezera. Mjereno Pb u ovom radu bilo je ispod granice detekcije primijenjene metode (<71 ng/L). U radu Cukrov i sur. (2008), korištenjem osjetljivije elektrokemijske metode, izmjerene su također vrlo niske koncentracije Pb u Visovačkom jezeru (~40 ng/L). Slično je i u slučaju Cu, koji je također bio ispod granice detekcije u ovom radu (<401 ng/L), a u radu Cukrov i sur. (2008) njegova koncentracija iznosila je ~200 ng/L. Važno je napomenuti da koncentracije metala u tragovima u oba rada nisu mjerene na istim postajama.

Naimo (1995) navodi koncentracije Zn u oksičnim površinskim vodama (30-560 ng/L) i u čistim vodama (30-200 ng/L). U odnosu na navedena mjerenja, Zn u ovom istraživanju je znatno povišen, budući da se njegove koncentracije u Visovačkom jezeru kreću oko 7200 i 9600 ng/L.

Koncentracije Zn, Cd, Pb i Cu izmjerene u Visovačkom jezeru vrlo su niske, uzimajući u obzir literaturne podatke o koncentracijama tih elemenata u slatkovodnim ekosustavima. Metali u tragovima koji putem otpadnih voda dopijevaju u gornji tok rijeke Krke, zadržavaju se unutar sustava malih jezera u gornjem dijelu toka, nastalih zbog sedrenih barijera (Cukrov i sur., 2008). Na početku donjeg dijela toka rijeke Krke, dolazi do ulijevanja njenih pritoka te taj unos čiste vode, u kombinaciji s odlaganjem metala na sedrenim barijerama, omogućuje dotok pročišćene vode u Visovačko jezero. Međutim, u nedavno provedenom istraživanju ekotoksičnih metala u sedimentima Visovačkog jezera, izmjerene koncentracije Cd i Zn u površinskim sedimentima još uvijek su bile 2-3 puta veće od prirodnih razina zabilježenih u

predindustrijskom dobu (Mikac i sur., 2015). Ovaj nalaz ukazuje da se sediment koji sadrži povećane koncentracije Cd i Zn, a koje su posljedica antropogenog unosa iz tvornice vijaka u Kninu, još i danas unosi rijekom Krkom u Visovačko jezero. Stoga, nešto više vrijednosti Zn izmjerene u ovom radu mogu se barem jednim dijelom objasniti njegovom većom prisutnošću u površinskim sedimentima jezera.

Koncentracije ostalih izmjerenih elemenata u ovom istraživanju prvi su rezultati za Visovačko jezero.

Raspodjela metala u vodi s obzirom na dubinu jezera uspoređena je s rezultatima istraživanja metala u Skadarskom jezeru (Vemić i sur., 2014). Skadarsko jezero je, kao i Visovačko, krško jezero te istodobno najveće jezero Balkanskog poluotoka. U Skadarskom jezeru mjereni su Al, Cu, Zn, Cd, Ca, K, Cr, Mg, Mn, Ni, Pb i Fe. Od navedenih metala, u jezerskoj vodi detektirani su samo K, Ca, Mg, Mn, Ni, i Al. Statistički značajna razlika postojala je između površinskih i dubinskih koncentracija Ca, Mg, Ni, Mn i Al, dok razlika koncentracija K nije bila statistički značajna. Za razliku od K u Skadarskom jezeru, mjerenje na Visovačkom jezeru i statistička analiza pokazali su statistički značajnu razliku između koncentracija kalija na površini i u dubini jezera. Razlike koncentracija Ca, Mg, Ni i Al u Visovačkom jezeru nisu statistički značajne, no razlika u koncentraciji Mn s obzirom na dubinu je, kao i u vodi Skadarskog jezera, statistički značajna.

4.1.2. Školjkaši

Školjkaši disanjem i hranjenjem, procesima olakšane difuzije, aktivnog transporta i endocitoze, unose metale iz okolne vode u organizam. Teški metali pohranjuju se u mišićima i mekom tkivu (organima). Unos metala je u početku, pri prvom izlaganju, vrlo brz, no zatim se usporava. U uvjetima gdje je koncentracija metala u vodi konstantna ili se povećava, školjkaši akumulacijom mogu dosegnuti mnogo više razine metala u organizmu u odnosu na okolnu vodu. Međutim, ukupna koncentracija nekog metala u vodi ne daje informaciju o njegovoj bioraspoloživosti, tj. o postotku metala koji može biti unesen u organizam.

Osim o bioraspoloživosti metala, bioakumulacija ovisi o mnogim drugim faktorima, a između ostaloga i o karakteristikama vrste. Za ovdje odabrani bioindikator, *Anodonta exulcerata*, ne postoje do sada objavljeni podaci o metalima u tkivu. Stoga će izmjerene koncentracije metala u ovom istraživanju biti uspoređene s dostupnim literaturnim podacima o metalima

izmjerenima u probavnoj žlijezdi školjkaša roda *Anodonta*, budući da bioakumulacija metala nije jednaka u svim organima.

Najniže koncentracije ukupnog metala probavne žlijezde školjkaša u ovom istraživanju izmjerene su za Cs, Sb i Bi, dok su najviše koncentracije očekivano imali makroelementi, pogotovo K i Ca. Ukupna koncentracija metala u probavnoj žlijezdi školjkaša veća je od koncentracije metala u okolnoj vodi za sve osim za makroelemente (Mg, Na, K, Ca) te za V, Mo, Cr, Ni i Sr. Koncentracija navedenih elemenata bila je niža u probavnoj žlijezdi u odnosu na koncentraciju metala u vodi. Školjkaši u određenoj mjeri mogu regulirati unos esencijalnih metala (npr. Cu i Zn), stoga koncentracije metala u vodi nisu izravno proporcionalne opterećenju tkiva metalima (Farris i Van Hassel, 2007).

Dobivene koncentracije uspoređene su s rezultatima istraživanja Falfushynska i sur. (2014), gdje je mjerena koncentracija Cu, Zn i Cd u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta anatina* na tri lokacije. Cu izmjeren u ovom istraživanju iznosio je 8,1 µg/g tkiva u plićem dijelu, odnosno 4,3 µg/g tkiva u dubljem dijelu jezera, dok je u spomenutom radu njegova koncentracija iznosila 4-7 µg/g, ovisno o lokaciji uzorkovanja. Koncentracija Zn u školjkašima u ovom je istraživanju iznosila 52,4 µg/g u plićem, odnosno 25,7 µg/g u dubljem dijelu jezera, dok je u spomenutom radu njegova koncentracija iznosila 55-90 µg/g. Koncentracija Cd u ovom je mjerenju bila niža od sve tri koncentracije izmjerene u radu Falfushynska i sur. (2014).

Falfushynska i sur. (2013) u svom istraživanju izložili su jedinke školjkaša *Anodonta anatina* povišenim koncentracijama nekih metala te između ostaloga, povišenoj koncentraciji Cu (10 µg/L) tijekom 14 dana. Školjkaši *A. exulcerata* u ovom istraživanju prikupljeni su iz jezerske vode s vrlo niskom koncentracijom Cu, ispod granice detekcije (<0,401 µg/L). Međutim, najviša izmjerena koncentracija Cu u školjkašu *A. anatina*, unatoč izloženosti vrlo visokim koncentracijama Cu u okolnoj vodi, bila je 2 puta manja od koncentracije Cu u *A. exulcerata* iz Visovačkog jezera, u čijoj je vodi koncentracija Cu vrlo niska.

Na bioakumulaciju znatno utječe sastav metala i organskih tvari u okolnoj vodi. Metali se u vodenom okolišu nalaze u različitim oblicima, koji često ovise o tome koji su još metali prisutni u vodi. Učinak jednog zasebnog metala razlikuje se od učinka istog metala u smjesi metala (Farris i Van Hassel, 2007). Hemelraad i sur. (1987) pri izlaganju *A. cygnea* povišenim koncentracijama Cd te smjesi Cd i Zn uočili su da je unos Cd bio smanjen u prisutnosti Zn. U slatkovodnim školjkašima koncentracija Cd varira između 5,8 i 600 µg/g ovisno o vrsti,

razdoblju izloženosti i koncentraciji Cd. U ovom istraživanju koncentracija Cd bila je vrlo niska.

Unos Pb među školjkašima je spor i povezan s bioakumulacijom u škrgama. U radu Gundacker (2000) navodi da je koncentracija Pb u vodi rijeke Dunav bila viša nego u tkivu *Anodonta* sp., a kao mogući razlog tomu pretpostavljena je niska razina bioraspodivnosti Pb. U ovom istraživanju koncentracija Pb u tkivu školjkaša bila je viša nego u vodi jezera, gdje je bila ispod granice detekcije.

Koncentracije Ag u tkivima beskralješnjaka uglavnom su vrlo niske te je koncentracija Ag u ovom istraživanju u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata* također bila među nižima. Mnogi u okolišu prisutni metali, poput Ni, manje su toksični nego npr. Cd, stoga postoji malo dostupnih literaturnih podataka o njima (Farris i Van Hassel, 2007).

U probavnoj žlijezdi školjkaša plićeg dijela Visovačkog jezera značajno su više bile koncentracije Tl, Pb, Ni, Rb, Cu, Zn i K, dok su u školjkaša dubljeg dijela jezera U, V, Cr, Se, As, Ba, Sr, Mg, Mn, Fe i Ca bili značajno viši.

Razlike u unosu metala s obzirom na dubinu moguće su zbog razlika u veličini i masi školjkaša (Ware, 1991). Školjkaši uzorkovani u plićem dijelu Visovačkog jezera imali su značajno veće školjke i masu u odnosu na školjkaše iz dubljeg dijela jezera. Prema Haukioja i Hakala (1978) školjkaši brže rastu u plitkim vodama više temperature nego u dubljim vodama niže temperature. Jedan od mogućih razloga za različit unos metala na različitim dubinama je sastav sedimenta. Koncentracija metala u sedimentu različita je na različitim dubinama, a školjkaši su, kao sjedilački organizmi, u stalnom kontaktu sa sedimentom u kojem se akumuliraju različiti metali. Mikac i sur., (2015) ustanovili su značajne razlike u granulometrijskom sastavu sedimenata površinskog i dubokog dijela Visovačkog jezera s obzirom na udio karbonatne i terigene komponente, kao i razliku u sadržaju metala vezanih uz svaku od ovih komponenata. Upravo se povećanim udjelom terigene komponente u sedimentima može objasniti pojačana akumulacija tipično terigenih elemenata (npr. Mn, Fe, Ba) u školjkaša uzorkovanih u dubljem dijelu Visovačkog jezera. Biogeokemijskim procesima metali iz sedimenta mogu se naći u stupcu vode iz kojega će filtracijom biti uneseni u školjkaša. Nadalje, razlike u unosu metala s obzirom na dubinu moguće su i zbog različitog unosa čestica. Školjkaši na povećanu izloženost metalima reagiraju zatvaranjem ljuske i smanjenjem stope filtracije (Katsallah i sur., 2013). Osim navedenih razloga, i

nedostatak hrane može utjecati na unos metala jer utječe na fiziologiju školjkaša (Naimo, 1995).

4.2. Stanični biomarkeri i metali

Povećanjem koncentracije metala u tkivima dolazi do njihovog vezanja na MT što potiče indukciju MT (Amiard i sur., 2006). Ag, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb i Zn pokazuju afinitet za S (npr. MT) i N ligande. Međutim, ako nema MT, navedeni metali vezat će se za granule kalcijevog fosfata (Farris i Van Hassel, 2007). Uz MT, koji vežu metale i na taj način štite organizam od potencijalnog toksičnog učinka, od velikog značenja je i GSH, koji štiti organizam od slobodnih radikala. Ravnoteža GSSG/GSH u organizmu važna je za homeostazu. Kvantitativne i kvalitativne promjene GSH-GSSG redoks sustava ukazuju na oksidativno oštećenje. Omjer GSSG:GSH u organizmu kreće se između 1:100 i 1:1000. Ako je, zbog izloženosti stresu ili smanjene aktivnosti glutation-reduktaze, omjer oksidiranog GSSG i reduciranog GSH promijenjen u korist GSSG, može doći do apoptoze stanica (Monostori i sur., 2009). Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, mnoga istraživanja pokazala su da određeni metali (npr. Fe, Cu, Cd, Cr, Ni, V) mogu uzrokovati stvaranje reaktivnih radikala u organizmu, što može dovesti do oštećenja DNA, lipidne peroksidacije i mnogih drugih neželjenih učinaka (Valko i sur., 2005). Uslijed lipidne peroksidacije dolazi do stvaranja MDA kao sekundarnog produkta. Koncentracija MDA može dati informaciju o oštećenju membrana lipidnom peroksidacijom (Placer i sur., 1966).

Izmjerena koncentracija MT u probavnoj žlijezdi *A.exulcerata* bila je znatno viša u školjkaša u dubljem dijelu, nego u plićem dijelu Visovačkog jezera. S druge strane, koncentracija GSH bila je znatno viša u školjkaša plićeg dijela u odnosu na one dubljeg dijela jezera. Koncentracije MDA u školjkašima nisu se statistički značajno razlikovale s obzirom na dubinu uzorkovanja.

4.2.1. Metalotioneini

Izmjerene koncentracije MT uspoređene su s rezultatima istraživanja Falfushynska i sur. (2014), gdje je mjerena koncentracija MT u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta anatina* na tri lokacije. Falfushynska i suradnici dobili su koncentracije MT 85 µg/g tkiva na postaji nezagađenoj industrijom, ali u blizini ispusta komunalnih voda; 115 µg/g u zagađenoj

rijeci u poljoprivrednom području; te 480 µg/g u blizini nuklearne elektrane Hmeljnicki u Ukrajini. Koncentracija MT u ovom istraživanju iznosila je 120 µg/g tkiva za školjkaše plićeg dijela, odnosno 140 µg/g tkiva za one dubljeg dijela jezera.

U drugom istraživanju, Falfushynska i sur. (2009), razine MT mjerene su u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta cygnea*. Koncentracije MT iznosile su 6300 µg/g tkiva u urbanom i 3400 µg/g tkiva u ruralnom području, gdje su vršena mjerenja. Koncentracija MT u Visovačkom jezeru višestruko je manja od ovih koncentracija.

4.2.2. Glutation

Koncentracija GSH bila je značajno viša u plićem dijelu Visovačkog jezera gdje je iznosila ~125 nmol/g tkiva nego u dubljem dijelu, gdje je izmjerena koncentracija ~85 nmol/g tkiva. Dobivene koncentracije uspoređene su s rezultatima istraživanja Falfushynska i sur. (2010), gdje je mjerena koncentracija GSH u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta cygnea* na tri lokacije. Na sve tri lokacije izmjerena je viša koncentracija GSH nego u našem istraživanju. GSH školjkaša u zagađenoj rijeci u poljoprivrednom području iznosio je ~0,2 mmol/g tkiva, dok je GSH školjkaša u blizini nuklearne elektrane Hmeljnicki iznosio ~0,32 mmol/g tkiva. GSH školjkaša na postaji nezagađenoj industrijom, ali u blizini ispusta komunalnih voda iznosio je ~0,8 mmol/g tkiva, što je ~6 puta viša koncentracija u odnosu na koncentraciju GSH izmjerenu u plićem dijelu Visovačkog jezera.

U svom istraživanju Nugroho i Frank (2012) izložili su školjkaše vrste *Anodonta anatina* povišenoj koncentraciji Cu tijekom 24 dana. Početna koncentracija GSH u probavnoj žlijezdi bila je 1600 nmol/g, a nakon izlaganja Cu pala je za 20 %. Izmjereni GSH u Visovačkom jezeru bio je ~10 puta niži (na površini). Općenito, GSH izmjeren u Visovačkom jezeru jedan je od nižih, uzimajući u obzir dostupne literaturne podatke o GSH u roda *Anodonta*.

4.2.3. Malondialdehid

Koncentracija MDA u probavnoj žlijezdi *Anodonta exulcerata* iznosila je ~15 nmol/g tkiva na plićem i dubljem dijelu Visovačkog jezera. Prosječne vrijednosti MDA mjerene u ovom radu niže su od vrijednosti zabilježenih u proljetnom razdoblju u probavnoj žlijezdi školjkaša *A. cygnea* uzorkovanih na jednoj ruralnoj (~22 nmol/g tkiva) i jednoj urbanoj (~40 nmol/g tkiva) lokaciji na rijeci Dnjestar u Ukrajini (Falfushynska i sur., 2009). U istom radu autori su, osim povišenih razina MDA kao pokazatelja lipidne peroksidacije, na urbanoj

lokaciji ustanovili i supresiju aktivnosti antioksidativnog enzima superoksid dismutaze (SOD) i povećanje razine kisikovih radikala, čime su nedvojbeno ukazali na prisutnost oksidativnog stresa u školjkaša s navedenog lokaliteta. S obzirom na to da su razine MDA mjerene u ovom radu niže čak i od onih ustanovljenih u školjkaša s ruralnog lokaliteta, na kojem inače nije u istom razdoblju dokazana prisutnost oksidativnog stresa, možemo zaključiti da je razina oksidativnog stresa u školjkaša s obiju dubina Visovačkog jezera vrlo niska.

4.2.4. Povezanost metala s biomarkerima

U ovom istraživanju porast koncentracije MT pokazao je pozitivnu i statistički značajnu korelaciju s nekoliko elemenata u citosolnoj frakciji probavne žlijezde: Se, Ag, Bi, U, V, Cu, Zn, As i Tl. Koncentracije Cu i Zn mjerene su u radu Falfushynska i sur. (2014) u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta anatina* te je ustanovljena pozitivna i statistički značajna korelacija oba elementa s MT. Njihovi rezultati ukazuju na to da je razina Zn vezanog na MT bila 3-7 puta viša nego razina Cu vezanog na MT. U odnosu na njih, razina Cd bila je vrlo niska, oko 1 atom Cd na 10 atoma Zn.

U školjkašima Visovačkog jezera nije ustanovljena korelacija MT i Cd. Li i sur. (2015) ustanovili su negativnu korelaciju razine MT i Cd u probavnoj žlijezdi *Anodonta woodiana* te su pretpostavili da se detoksikacija Cd u probavnoj žlijezdi odvija manje metalotioneinima, a više lizosomima. Ivanković i sur. (2010) pokazali su značajnu indukciju MT u slatkovodnom školjkašu *Dreissena polymorpha* nakon izlaganja povišenim koncentracijama Cd (10 500 µg/L) u vodi. Međutim, potrebno je istaknuti da su koncentracije Cd mjerene u ovom radu, bilo u vodi, bilo u tkivu probavne žlijezde, bile izuzetno niske te stoga vjerojatno nisu niti mogle značajnije utjecati na sadržaj MT u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata*.

Amiard i sur. (2008) ustanovili su pozitivnu, statistički značajnu korelaciju između koncentracija MT i V u školjkašu *Mytilus* sp.. Burger i sur. (2000) ustanovili su statistički značajnu i pozitivnu korelaciju MT i Se u jetrima rakuna.

Za Ag, Bi, U, As i Tl, koji su također pokazali statistički značajnu i pozitivnu korelaciju s MT u ovom istraživanju, nisu pronađeni literaturni podaci za usporedbu.

U probavnoj žlijezdi školjkaša Visovačkog jezera, od svih analiziranih metala, samo je za Rb ustanovljena pozitivna korelacija s koncentracijom GSH.

4.3. Unutarstanična raspodjela metala i metaloida

Ukupna koncentracija metala ponekad ne daje dovoljno realan prikaz učinaka metala na organizam, stoga je potrebno obratiti pažnju na koncentracije metala u topljivoj i netopljivoj frakciji tkiva, kao i na svojstva samog metala (Naimo, 1995). Toksični učinak metala na školjkaše ovisi o koncentraciji biološki raspoloživih oblika metala u vodenom okolišu, tj. o koncentraciji otopljenih metala. Neki metali imaju toksični učinak u otopljenom obliku, dok su u netopljivom obliku i elementarnom stanju zanemarive toksičnosti. Metali iz topljivog oblika mogu prijeći u netopljivi te iz vodenog okoliša na taj način biti pohranjeni u sediment. Citosolni (topljivi) metali daju sliku o biološki raspoloživom metalu, tj. o metalu koji može biti unesen u organizam te interakcijama s biološkim molekulama naštetiti organizmu (URL 4).

Uspoređene su koncentracije metala u topljivoj citosolnoj frakciji tkiva i u netopljivoj frakciji tkiva. U topljivoj frakciji su, u plićem i u dubljem dijelu jezera, više (>50 %) bili zastupljeni: Se, Mo, Rb, Cs, As, Na i K. U dubljem dijelu jezera Cd i Sb bili su više zastupljeni u topljivoj frakciji, dok su isti metali u plićem dijelu jezera bili više zastupljeni u netopljivoj frakciji. U netopljivoj frakciji, u plićem i dubljem dijelu jezera, više su bili zastupljeni: V, Co, Cu, Zn, Mn, Fe, Bi, U, Pb, Ni, Ti, Cr, Al, Ag, Tl, Ba, Sr, Mg i Ca.

Cassini i sur. (1986) istražili su raspodjelu nekih metala u školjkašu *Anodonta cygnea*. Njihovi rezultati pokazuju da je koncentracija Cd, Cu i Zn u probavnoj žlijezdi bila veća u netopljivoj frakciji tkiva, u odnosu na topljivu frakciju. U ostalim ispitivanim tkivima raspodjela navedenih elemenata po frakcijama je varirala.

Iako metali u topljivoj frakciji ponekad čine samo mali udio u ukupnom metalu, često bolje predstavljaju stvarno zagađenje (tj. bolje odgovaraju bioraspoloživoj frakciji metala) u odnosu na metale u netopljivoj frakciji ili ukupne metale (Langston i sur., 1998). Međutim, neki školjkaši unose određene metale u puno većem postotku u neotopljenom obliku, ili obrnuto, u otopljenom obliku. Primjerice, većina (99 %) Se u organizmu *Limecola balthica* potječe iz netopljive frakcije, stoga mjerenje koncentracije Se samo u topljivoj frakciji ne bi dalo rezultate koji odgovaraju stvarnoj koncentraciji tog elementa u organizmu.

Povećanje ukupnih koncentracija Se, Cu, Zn, Mn, Fe, Tl, Cr, Ba, Sr, Ag, Cd, Al, Mg i Ca u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata* praćeno je statistički značajnim smanjenjem njihovih udjela u topljivoj frakciji. S promjenom dubine (i koncentracije metala) mijenja se i udio metala u

topljivoj frakciji. U probavnoj žlijezdi školjkaša dubljeg dijela jezera izmjerene su više ukupne koncentracije Se, Mn, Fe, Cr, Ba, Sr, Al, Mg i Ca te niži postotni udjeli topljive frakcije. Više ukupne koncentracije i niži postotni udjeli topljive frakcije izmjerene su za Tl, Ag, Cd, Cu i Zn u školjkašima plićeg dijela jezera. Porast koncentracije V, U, Pb, Ni, Rb, As, K nije praćen značajnim promjenama u raspodjeli između topljive i netopljive frakcije tkiva.

Iz rezultata ovog rada (Tablice 7, 9 i 11) vidljivo je da su pojedini elementi, neovisno o dubini uzorkovanja školjkaša, pokazivali određene specifičnosti u ponašanju s obzirom na način kako su se raspođjeljivali između topljive i netopljive frakcije tkiva pri povećanoj akumulaciji. Pa tako većina esencijalnih elemenata (V, Se, Mn, Fe, Cu, Zn, Mg i Ca) te neki od analiziranih neesencijalnih elemenata (kao što su Cd, Ag, Tl, Cs, Cr, Al, Ba i Sr) su, kod povećanog unosa, novoakumulirani metal većim dijelom odjeljivali u netopljivoj frakciji tkiva, dok su neesencijalni elementi Rb, Pb, Ni, U i As te esencijalni K, pri povećanom unosu povećavali koncentracije metala u obje frakcije uz zadržavanje iste razine postotne zastupljenosti u svakoj od frakcija.

Kako bi spriječili toksično djelovanje metala, školjkaši koriste različite homeostatske mehanizme kao što su stvaranje netopljivih taloga u obliku granula, odjeljivanje unutar lizosoma, te vezivanje za specifične topljive ligande od kojih je najvažniji MT (Viarengo i Nott, 1993). Iako rezultati ovog rada upućuju na određene specifične obrasce raspodjele metala u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata* kod povećane akumulacije, dodatna istraživanja pri višim razinama izloženosti od ovih zabilježenih u ovom radu su neophodna kako bi se ustanovili mehanizmi kojima *A. exulcerata* kontrolira sadržaj metala u stanici, odnosno njihovu unutarstaničnu raspodjelu.

5. ZAKLJUČCI

Istraživanje je dalo osnovnu sliku o razlikama u izloženosti metalima između jedinki školjkaša *A. exulcerata* koji obitavaju u plićim i dubljim dijelovima Visovačkog jezera. Također su dobiveni podaci o raspodjeli pojedinih elemenata između topljive (koja sadrži citosolne proteine, lizosome i mikrosome i smatra se potencijalno toksičnom frakcijom metala) i netopljive (koja uključuje granule, dijelove staničnih membrana i mitohondrije te se smatra da sadrži detoksicirani metal) frakcije tkiva probavne žlijezde uzorkovanih školjkaša te o povezanosti biomarkerskih odgovora s razinama akumuliranih metala u probavnoj žlijezdi.

1. Analiza uzoraka jezerske vode ukazala je na relativno niske razine otopljenih metala u vodi Visovačkog jezera, a od 30 analiziranih elemenata, razlike s obzirom na dubinu uzorkovanja ustanovljene su samo za Cd, Rb, Mo, Mn, Li, Fe, Sr, K i Na, čije su vrijednosti bile umjereno povišene na dubljem lokalitetu.

2. Analiza sadržaja ukupnih metala u probavnoj žlijezdi *A. exulcerata* ukazala je na značajne razlike u bioraspoloživosti pojedinih metala u plićem i dubljem dijelu Visovačkog jezera. Školjkaši s dubljeg lokaliteta akumulirali su više V, Se, Mn, Fe, Mg, Ca, U, Cr, As, Ba i Sr, dok su Cu, Zn, K, Tl, Pb, Rb i Ni bili značajno više akumulirani u školjkaša s plićeg lokaliteta. Uočena je slaba povezanost sadržaja metala u probavnoj žlijezdi s otopljenim metalima u vodi te su jedino koncentracije Mn, Fe i Sr pratile trend porasta metala u vodi.

3. Analiza raspodjele metala između topljive i netopljive frakcije tkiva probavne žlijezde ukazala je na specifične obrasce raspodjeljivanja pojedinih elemenata između ovih dviju frakcija pri povećanoj akumulaciji. Prva skupina elemenata, koja uključuje esencijalne elemente V, Se, Mn, Fe, Cu, Zn, Mg i Ca te neesencijalne Cd, Ag, Tl, Cs, Cr, Al, Ba i Sr, pri porastu akumulacije u probavnoj žlijezdi povećava udio metala u netopljivoj frakciji kao znak njihove vjerojatne detoksikacije, dok druga skupina elemenata, u koju spadaju neesencijalni elementi Rb, Pb, Ni, U i As te esencijalni K, pri povećanoj akumulaciji povećava koncentracije metala u obje frakcije uz održavanje iste razine postotne zastupljenosti u svakoj od frakcija.

4. Analiza biomarkera izloženosti metalima (metalotionein) ukazala je na značajno veću izloženost školjkaša s dubljeg lokaliteta, a više vrijednosti MT na dubljem lokalitetu vjerojatno se mogu povezati s citosolnim koncentracijama Se, Ag, Bi, U, V, Cd, Cu, Zn, As i Tl koji su također bili umjereno povišeni na ovom lokalitetu. Koncentracija biomarkera

glutaciona značajno je povišena u školjkaša s površinskog lokaliteta, a od analiziranih citosolnih metala jedino je Rb pokazao značajnu korelaciju s ovim biomarkerom. Ostali analizirani biomarkeri (ukupni citosolni proteini i malondialdehid) nisu pokazali značajne razlike s obzirom na dubinu uzorkovanja.

5. Rezultati dobiveni ovim radom predstavljaju prve podatke takve vrste u *A. exulcerata* te kao takvi mogu poslužiti kao polazna osnova za usporedbe u budućim studijama monitoringa onečišćenja metalima.

6. LITERATURA

Adams S.M., Shepard K.K., Greeley M.S.Jr, Jimenez B.D., Ryan M.G., Shugart L.R., McCarthy J.F., Hinton D.E. (1989): The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* **28**: 459 – 464.

Akerboom T.P.M., Sies, H. (1981): Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology* **77**: 373 – 382.

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.

Amiard J.C., Journel R., Bacheley H. (2008): Influence of field and experimental exposure of mussels (*Mytilus sp.*) to nickel and vanadium on metallothionein concentration. *Comparative Biochemistry and Physiology – C Toxicology and Pharmacology* **147**: 378 – 385.

Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Rainbow P.S. (2013): *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Boca Raton.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248 – 254.

Burger J., Lord C.G., Yurkow E.J., McGrath L., Gaines K.F., Brisbin I.L., Gochfeld M. (2000): Metals and metallothionein in the liver of raccoons: Utility for environmental assessment and monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health – Part A* **60**: 243 – 261.

Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G. (1999): Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* **46**: 67 – 76.

Cassini A., Tallandini L., Favero N., Albergoni V. (1986): Cadmium bioaccumulation studies in the freshwater molluscs *Anodonta cygnea* and *Unio elongatulus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative* **84**: 35 – 41.

Chapman D. (1996): *Water Quality Assessments – A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental monitoring – Second Edition*. University Press, Cambridge.

Couillard Y., Campbell P.G.C., Tessier A. (1993): Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnology and Oceanography* **38**: 299 – 313.

Cukrov N. (2008): Tragovi metala u „čistim“ vodama na primjeru rijeke Krke. U: *Voda i mi III*, (ur.) Spevec S. , 17 – 20. Hrvatsko geološko društvo, Zagreb.

Cukrov N., Cmuk P., Mlakar M., Omanović D. (2008): Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of the self-purification. *Chemosphere* **72**: 1559 – 1566.

Cukrov N., Blatarić A.-M., Cuculić V., Grabar I., Kwokal Ž., Mlakar M., Omanović D., Pižeta I. (2011): Ispitivanje antropogenog utjecaja (ekotoksični metali) na sedimente Brljana i nizvodnih jezera. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Cukrov N., Cuculić V., Barišić D., Lojen S., Mikelić I.L., Oreščanin V., Vdović N., Fiket Ž., Čermelj B., Mlakar M. (2013): Elemental and isotopic records in recent fluvio-lacustrine sediments in karstic river Krka, Croatia. *Journal of Geochemical Exploration* **134**: 51 – 60.

Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **15**: 316 – 328.

Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.-C., Babut M., Vasseur P. (1997): Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* **39**: 93 – 110.

Dressing S.A. (2007): Purposes of Chemical, Physical and Biological Monitoring. PowerPoint prezentacija. Preuzeto s <https://www.ctic.org/>, 19.9.2017.

Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O., Kawabata Z., Knowler D.J., Lévêque C., Naiman R.J., Prieur-Richard A.H., Soto D., Stiassny M.L. Sullivan C.A. (2006): Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* **81**: 163 – 182.

Europski parlament i Vijeće Europske unije (2008): Direktiva 2008/105/EZ. Službeni list Europske unije, <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>. Ustupljeno 28.12.2017.

Falfushynska H.I., Delahaut L., Stolyar O.B., Geffard A., Biagianti-Risbourg S. (2009): Multi-biomarkers approach in different organs of *Anodonta cygnea* from the Dnister Basin (Ukraine). Archives of Environmental Contamination and Toxicology **57**: 86 – 95.

Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Golubev A.P., Stolyar O.B. (2010): Main Partitioning Criteria for the Characterization of the Health Status in the Freshwater Mussel *Anodonta cygnea* from Spontaneously Polluted Area in Western Ukraine. Environmental Toxicology **27**: 485 – 494.

Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Stolyar O.B. (2013): Effect of in situ exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Unionidae) to trace metals. Ecotoxicology and Environmental Safety **89**: 73 – 83.

Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Gyori J., Stolyar O.B. (2014): Metallothioneins, Caspase-3 and oxidative stress responses in the multi-marker study of freshwater mussel inhabiting sites of various human impact. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **14**: 591 – 603.

Farris J.L., Van Hassel J.H. (2007): Freshwater Bivalve Ecotoxicology. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola.

Fiket Ž., Roje V., Mikac N., Kniewald G. (2007): Determination of arsenic and other trace elements in bottled waters by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. Croatica Chemica Acta **1**: 91 – 100.

Forman H.J., Zhang H.Q., Rinna A. (2009): Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. Molecular Aspects of Medicine **30**: 1 – 12.

Froufe E., Lopes-Lima M., Riccardi N., Zaccara S., Vanetti I., Lajtner J., Teixeira A., Varandas S., Prié V., Zieritz A., i sur. (2017): Lifting the curtain on the freshwater mussel diversity of the Italian Peninsula and Croatian Adriatic coast. Biodiversity and Conservation **26**: 3255 – 3274.

Goreta G. (2013): Procjena antropogenog utjecaja na kvalitetu rijeke Krke na području Visovačkog jezera. BUK – Glasnik Javne ustanove „Nacionalni park Krka“ **8**: 90 – 93. Preuzeto s <http://www.npkrka.hr/buk/buk8/files/assets/seo/page1.html>, 10.11.2017.

Gundacker C. (2000): Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. *Environmental Pollution* **110**: 61 – 71.

Gupta S.K., Singh J. (2011): Evaluation of Mollusc as Sensitive Indicator of Heavy Metal Pollution in Aquatic system: a Review. *IIOAB Journal* **2**: 49 – 57.

Hamza-Chaffai A. (2014): Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **3**: 19 – 26.

Haukioja E., Hakala T. (1978): Measuring growth from shell rings in populations of *Anodonta-Piscinalis* Pelecypoda Unionidae. *Annales Zoologici Fennici* **15**: 60 – 65.

Hemelraad J., Kleinveld H.A., Roos A.M., Holwerda D.A., Zandee D.I. (1987): Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**: 95 – 101.

Horvat F. (2016): Bioakumulacija i utjecaj srebrnih nanočestica na unutarstaničnu raspodjelu metala i metalotioneina u gujavice *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Ivanković D. (2006): Ekotoksikološko značenje metalotioneina i stabilnosti lizosomskih membrana dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lam. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Ivanković D., Pavičić J., Beatović V., Sauerborn Klobučar R., Klobučar G.I.V. (2010): Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper and pentachlorophenol. *Environmental Toxicology*, **25**: 198 – 211.

Katsallah G.I.M., Rukayya M., Sambo D., Sule T.G. (2013): Comparative Metal Analysis of the Soft Tissues of Three Species of *Anodonta* (Class: Bivalvia) From Kubanni Lake in Zaria Nigeria. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* **6**: 18 – 23.

Koeman J.H., Köhler-Günther A., Kurelec B., Rivière J.L., Versteeg D., Walker C.H. (1993): Applications and Objectives of Biomarker Research. U: Biomarkers: Research and Application in the Assessment of environmental health, (ur.) Peakall D.B. i Shugart L.R. NATO ASI Series (Advanced Science Institutes Series), vol **68**. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kowalczywska-Madura K., Gołdyn R. (2006): Anthropogenic changes in water quality in the Swarzędzkie Lake (West Poland). *Limnological Review* **6**: 147 – 154.

Langston W.J., Bebianno M.J. (1998): Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chapman & Hall, London.

Li Y., Yang H., Liu N., Luo J., Wang Q., Wang L. (2015): Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in cadmium-treated freshwater mussel *Anodonta woodiana*. *PLoS ONE* **10**.

Liu H., Yang J., Gan J. (2010): Trace element accumulation in bivalve mussels *Anodonta woodiana* from Taihu Lake, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **59**: 593 – 601.

Lopes-Lima M., Sousa R., Geist J., Aldridge D.C., Araujo R., Bergengren J., Bernal Y., Bódis E., Burlakova L., Van Damme D., i sur. (2017): Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews* **92**: 572 – 607.

Manly R., George W.O. (1977): The occurrence of some heavy metals in populations of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (L.) from the river Thames. *Environmental Pollution* (1970) **14**: 139 – 154.

Marguš D. (2015): Prirodna baština. BUK – Glasnik Javne ustanove „Nacionalni park Krka“ **12**: 40 – 45.

Mason A.Z., Jenkins K.D. (1995): Metal detoxication in aquatic organisms. U: Metal speciation and bioavailability in aquatic systems, (ur.) Tessier A. i Turner D.R., 479 – 608. John Wiley & Sons, Chichester.

Mikac N., Bačić N., Lučić M., Ivanić M., Vdović N., Barišić D. (2015): Raspodjela metala i metaloida u sedimentu i vodi ušća rijeke Krke. U: Zbornik radova sa znanstveno-stručnog skupa Vizija i izazovi upravljanja zaštićenim područjima prirode u Republici Hrvatskoj:

aktivna zaštita i održivo upravljanje u Nacionalnom parku Krka, (ur.) Marguš, D., 2017., 671 – 685. Javna ustanova „Nacionalni park Krka“, Šibenik.

Mlakar M., Kwokal, Ž. (2007): Važnost točnog određivanja prirodnih koncentracija tragova ekotoksičnih metala u vodama RH. U: Zbornik radova sa 4. hrvatske konferencije o vodama s međunarodnim sudjelovanjem Hrvatske vode i Europska unija – izazovi i mogućnosti, (ur.) Gereš D., 2007., 171 – 176. Sveučilišna tiskara, Zagreb.

Monostori P., Wittmann G., Karg E., Túri S. (2009): Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **877**: 3331 – 3346.

Naimo T.J. (1995): A Review of the Effects of Heavy Metals on Freshwater Mussels. *Ecotoxicology* **4**: 341 – 362.

Nugroho A.P., Frank H. (2012): Effects of copper on lipid peroxidation, glutathione, metallothionein, and antioxidative enzymes in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. *Toxicological and Environmental Chemistry* **94**: 918 – 929.

Placer Z.A., Cushman L.L., Johnson B.C. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry* **16**: 359 – 364.

Radović J., Čivić K., Topić R., Posavec Vukelić V. (2009): Biološka raznolikost Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Ministarstvo kulture Republike Hrvatske, Zagreb. Preuzeto s <https://docslide.com.br/documents/bioloska-rznolikost-hrvatske.html>, 30.10.2017.

Roesijadi G. (1992): Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* **22**: 81 – 114.

Stolyar O.B., Myhayliv R.L., Mischuk, O.V. (2005): The concentration-specific response of metallothioneins in copper-loading freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* **77**: 68 – 72.

Streit B., Winter S. (1993): Cadmium uptake and compartmental time characteristics in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. *Chemosphere* **26**: 1479 – 1490.

Šapina, M. (2014): Dinamika makrozooplanktona u Visovačkom jezeru. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Šorgić B., Antunović, B. (2010): Izvješće o stanju okoliša Šibensko-kninske županije. Oikon d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju, Zagreb.

Štambuk A. (2011): Utjecaj onečišćenja na genetičku raznolikost populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Ujčić, P. (2015): Antropogeni i prirodni ugljikovodici u sedimentima Visovačkog jezera. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Valko M., Morris H., Cronin M. (2005): Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 1161 – 1208.

Vemić M., Rousseau D., Du Laing G., Lens P. (2014): Distribution and fate of metals in the Montenegrin part of Lake Skadar. *International Journal of Sediment Research* **29**: 357 – 367.

Viarengo A., Nott J.A. (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative* **104**: 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., Dondero F., Marro A., Fabbri R. (1999): Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* **4**: 455 – 466.

Vlada Republike Hrvatske (1998): Uredba o klasifikaciji voda (NN 77/98). Narodne novine d.d., Zagreb.

Vlada Republike Hrvatske (1998): Uredba o opasnim tvarima u vodama (NN 78/98). Narodne novine d.d., Zagreb.

Ware G.W. (1991): *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer-Verlag, New York.

Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J., Jiang G. (2008): Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* **606**: 135 – 150.

Internetski izvori:

URL 1: Oregon State University

(<http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/riboflavin>, 17.1.2018.)

URL 2: Javna ustanova NP Krka

(<http://www.npkrka.hr/stranice/rijeka-krka/85.html>, 28.10.2017.)

URL 3: Dinarsko gorje

(<https://www.dinarskogorje.com/dalmatinski-slivovi.html>, 20.10.2017.)

URL 4: Dartmouth Toxic Metals Superfund Research Program

(<http://www.dartmouth.edu/~toxmetal/toxic-metals/metals-primer.html>, 7.1.2018.)

Životopis

Rođena sam 13. srpnja 1993. u Zagrebu, gdje sam pohađala OŠ Dobriše Cesarića te II. gimnaziju. Nakon završetka gimnazije 2012., upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija, upisala sam 2015. godine. U okviru studija obavila sam stručnu praksu u Hrvatskom veterinarskom institutu, stručnu praksu na Zavodu za kliničku mikrobiologiju u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ te sam sudjelovala u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ od 2013. do 2017. godine. Tijekom zimskog semestra akademske godine 2014./2015. bila sam demonstrator na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a na kolegiju „Opća zoologija“. Za vrijeme studija volontirala sam u Botaničkom vrtu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, a tijekom zadnje godine studija tamo sam radila kao stručni vodič. Aktivna sam članica Udruge studenata biologije BIUS, u okviru koje sam bila voditeljica Sekcije za kopnene vode, bila uključena u istraživačko-edukacijske projekte „Papuk 2015.“ i „Mura-Drava 2016.“ te sudjelovala na manifestaciji „Znanstveni piknik 2017.“. Istraživanje za diplomski rad provela sam u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Dušice Ivanković, a dio podataka iz provedenog istraživanja predstavljen je u obliku posterskog izlaganja na „2. Simpoziju o biologiji slatkih voda“ 17.2.2017. na PMF-u u Zagrebu (objavljen sažetak: Dragičević P., Ivanković D., Lajtner J., Dragun Z., Krasnići N., Filipović Marijić V., Trgovčić K., Erk M. (2017) Akumulacija metala i biomarkeri izloženosti metalima u probavnoj žlijezdi školjkaša *Anodonta* spp. iz Brljanskog i Visovačkog jezera).