Konhološke značajke i kemijski sastav kućica slatkovodnog puža Holandriana holandrii (C. Pfeiffer, 1828)

Miklečić, Mateja

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:865317

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mateja Miklečić

Konhološke značajke i kemijski sastav kućica slatkovodnog puža *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828)

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Lajtner te na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sande Rončević i neposrednim voditeljstvom Ivana Nemeta, dipl. ing.. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

Najveće zahvale mojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Jasni Lajtner i izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević na korisnim savjetima te stručnoj pomoći koje su mi pružile tokom izrade pismenog dijela ovog diplomskog rada. Isto tako, zahvaljujem se i neposrednom voditelju Ivanu Nemetu, dipl. ing. koji je strpljivo slušao sva moja pitanja te nesebično pomagao prilikom izrade praktičnog dijela ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima, anđeoskim pomagačima, kao i ostalim članovima obitelji, koji su uvijek bili uz mene, omogućili mi fakultetsko obrazovanje i pomogli mi da danas budem to što jesam.

I naravno, zahvaljujem se osobi koja mi je dosad bila veliki oslonac i podrška, a s kojom me nove životne avanture tek čekaju!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Konhološke značajke i kemijski sastav kućica slatkovodnog puža *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828)

Mateja Miklečić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glavni cilj ovog rada bio je utvrditi morfološke značajke i metodom ICP-AES odrediti kemijski sastav kućica slatkovodne vrste *H. holandrii* te utvrditi razlike i sličnosti u mjerenim vrijednostima. Ukupno je analizirano osam populacija, šest iz Hrvatske i dvije iz Srbije. Uzorci su prikupljeni ručno u periodu od 2008. do 2016. godine. Iz svake populacije nasumično je odabrano 30 odraslih jedinki kojima su napravljena morfometrijska mjerenja, a njih 10 podvrgnuto je kemijskoj analizi. Rezultati morfometrijskih mjerenja pokazali su da jedinke iz Cetine imaju najniže srednje vrijednosti svih značajki dok su jedinke iz Korane imale najviše srednje vrijednosti visine kućice, ušća i zavojnice. Iz omjera morfometrijskih značajki vidljivo je da se kućice puževa iz Maje i Cetine najviše razlikuju od ostalih. Vrijednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije ukazuju da je većina omjera statistički značajno međusobno srednje povezana te su ti omjeri međusobno proporcionalni. U otopinama uzorka utvrđen je sadržaj ukupno dvanaest kemijskih elemenata. Multivarijatnom analizom utvrđena je elementna podjela glavnih komponenata na dvije skupine dok je klasterskom analizom ustanovljena najveća sličnost između populacija uzorkovanih u Kupi i Uni, a populacije puževa iz Maje i Drine najviše se razlikuju od ostalih.

(54 stranice, 24 slika, 8 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mekušci, slatkovodni puževi, ICP-AES metoda, morfometrija

Voditelji: izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Neposredni voditelj: Ivan Nemet, dipl. ing.

Ocjenitelji: . izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 04.07.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department od Biology

Graduation-Thesis

Conchological characters and chemical composition of the shell of the freshwater snail *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828)

Mateja Miklečić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The main objective of this activity was to determine the morphological features and with ICP-AES method determine the chemical composition of the shell of the freshwater snail *H. holandrii* and to identify similarities and differences in the measured values. Eight populations were analyzed all together, six from Croatia and two from Serbia. Samples were collected manually in the period from 2008. to 2016. Of each population, randomly, 30 adults individuals were selected and morphometric characteristics of the shell shape were measured. Ten were subjected to a chemical analysis. The results of morphometric measurements have shown that Cetina individuals have the lowest mean values of all features, while the Korana individuals had the highest mean values shell length, aperture length and hight spire. From the morphometric aspect ratio it is apparent that the snail from Maja and Cetina differ most from the rest. Pearson correlation coefficient indicated that most of the ratios are statistically significantly interrelated and these proportions are proportional to each other. The sample solution contained the contents of twelve elements. Multivariate analysis determined the basic division of the main components into two groups, while the cluster analysis showed the highest similarity between population collected at the sites of the Kupa and Una, the population of snails from Maja and Drina differed most from others.

(54 pages, 24 figures, 8 tables, 43 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: molluscs, freshwater snails, ICP-AES method, morphometry

Supervisor: Dr. Jasna Lajtner, Asst. Prof.
Dr. Sanda Rončević, Asst. Prof.
Ivan Nemet, Assistant Supervisor

Reviewers: Dr. Jasna Lajtner, Asst. Prof
Dr. Sanda Rončević, Asst. Prof.
Dr. Ines Radanović, Asst. Prof.

Thesis accepted: 04.07.2018.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Osnovne značajke koljena mekušaca (Mollusca) 1

1.2. Osnovne značajke razreda puževi (Gastropoda) 2

1.3. Biomineralizacijski procesi prisutni tijekom izgradnje kućice puža 5

1.4. Slatkovodni puževi 7

1.4.1. Slatkovodna vrsta *Holandriana holandrii* 8

1.5. Atomska spektroskopija 11

1.5.1. Atomska emisijska spektrometrija 11

1.6. Atomska emisijska sprektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) 12

1.6.1. Instrumentacija 13

1.6.2. Analitičke značajke induktivno spregnute plazme 15

1.7. Određivanje metala u biološkim uzorcima 15

1.7.1. Ciljevi istraživanja 16

2. MATERIJALI I METODE 17

2.1. Područje istraživanja 17

2.2. Laboratorijska obrada uzoraka 18

2.3. Kemijska analiza 19

2.4. Priprema uzoraka za analizu 19

2.5. Mjerni postupci 21

2.6. Značajke instrumenta 23

2.7. Statistička obrada podataka 24

2.7.1. Morfometrijska analiza 24

2.7.2. Kemometrijska analiza 25

3. REZULTATI 26

3.1. Rezultati morfometrijske analize 26

3.2. Rezultati kemijske analize 34
4. RASPRAVA 42
5. ZAKLJUČAK 48
6. LITERATURA 50
7. ŽIVOTOPIS 54

1. UVOD

1.1. Osnovne značajke koljena mekušaca (Mollusca)

Mekušci su, s brojkom od preko 81 000 opisanih vrsta vrlo raznoliko koljeno beskralježnjaka. Najveći broj pripada morskim vrstama (55 000), manji broj je kopnenih (20 000), a samo 6 000 pripada slatkovodnim vrstama (Bouchet, 2007).

Mekušci su bilateralno simetrične ili sekundarno asimetrične životinje. Najveći dio tijela mekušaca čini mišićno stopalo smješteno s trbušne strane. Ostatak tijela mekušaca čine organi smješteni unutar utrobne vreće zaštićeni plaštom. Plašt se prostire s dorzalne strane tijela mekušaca. On na površinu tijela izlučuje kutikulu s uloženim vapnenim iglicama ili pločicama. Tijekom evolucijskog napretka struktura tijela mekušaca se mijenjala. Kod odvedenijih skupina došlo je do razvitka ljušture. Iznimno je kod razreda puževa i glavonožaca u nekih vrsta ljuštura sekundarno reducirana. Između plašta i stopala koje im ujedno omogućava kretanje smjestila se plaštana šupljina s respiratornim organima te izvodima reproduktivnog, ekskrecijskog i probavnog sustava. Smatra se da su prvobitni mekušci imali nekoliko pari škrga, poznatih još pod nazivom ktenidije, koje su im omogućavale disanje. Danas, većina ima jedan par škrga ili samo jednu škrgu. Svaka škrga ima dovodnu i odvodnu krvnu žilu kojom se kisik iz škrga prenosi u tkiva putem hemolimfe. Središnji živčani sustav mekušaca sastoji se od nekoliko pari ganglija i dva para živčanih vrpci stoga ga još nazivamo tetraneuralnim živčanim sustavom. Prvotno su se mekušci hranili algama i drugim sitnim organizmima pričvršćenim na podlogama na kojima su obitavali. Danas, manji broj mekušaca hranu dobiva filtracijom dok su ostali makrofagni herbivori ili karnivori. Ovisno o tipu prehrane, za usitnjavanje su razvili radulu koja je građena od sitnih hitinskih zubića i hrskavične osnovice. Iznimka su školjkaši koji sami stvaraju struju vode iz koje procjeđivanjem uzimaju sitne čestice potrebne za rast i razvoj. Isto kao i radula, probavilo mekušaca prilagođeno je tipu prehrane. Tijekom embrionalnog razvoja došlo je do nastajanja sekundarne tjelesne šupljine ili celoma koji je kod mekušaca jako reduciran i ograničen na područje oko srca (osrčje, perikard) i gonada (gonocel). Optjecajni sustav je otvoren i oksigenirana hemolimfa se iz škrga odvodnom krvnom žilom dovodi u pretklijetke, klijetke, aortu koja ju putem manjih arterija krvlju izljeva u hemocel

oko tjelesnih organa. Za ekskreciju, mekušcima služi jedan par metanefridija, oblika vreće debelih stijenka koji urin kroz nefridiopore izbacuju u plaštanu šupljinu (Habdija i sur., 2011).

Većina mekušaca koristi suživot s organizmima kao što su cijanobakterije, alge, spužve, mahovnjaci i plaštenjaci, koji im pomaže u obrani od predatora, pruža utočište od grabežljivaca te služi kao izvor kemijske obrane. Isto tako, za poboljšanje obrane, mekušci koriste sekundarne metabolite plijena.

Mekušci su sistematski podijeljeni u sedam razreda: Aplacophora (bezljušturaši), Polyplacophora (mnogoljušturaši), Monoplacophora (jednoljušturaši), Gastropoda (puževi), Cephalopoda (glavonošci), Bivalvia (školjkaši) i Scaphopoda (koponošci) (Habdija i sur., 2011).

1.2. Osnovne značajke razreda puževi (Gastropoda)

Puževi, s 70 000 opisanih, odnosno s više od 105 000 recentnih i 15 000 fosilnih (Matoničkin i sur., 1998) vrsta predstavljaju najbrojniji i najraznovrsniji razred mekušaca. Prilagodili su se slanim, slatkim, bočatim vodama te životu na kopnu (Habdija i sur., 2011).

Kolonizirali su kopnene vode, ponajviše slatkovodna staništa s najmanje 33-38 nezavisnih linija puževa (Strong i sur., 2008). Na području Hrvatske živi oko 300 vrsta kopnenih i oko 200 vrsta slatkovodnih puževa (Habdija i sur., 2011).

Najstariji pronađeni fosilni nalazi iz kambrija pokazuju kako su puževi primarno živjeli isključivo u bentosu morskih staništa, gdje su se prilagodili svim tipovima morskog dna. Evolucijskim razvojem, brojnim funkcionalnim, morfološkim i anatomskim obilježjima prilagodili su se na različite životne uvjete odnosno razvili su prilagodbe za pelagički način života te život na kopnu. Razvitkom „pluća“ osvojili su kopnena staništa. Upravo su oni danas zastupljeni s najvećim brojem vrsta dok su slatkovodna staništa zastupljena s najmanjim brojem vrsta (Habdija i sur., 2011).

Recentni puževi podijeljeni su u dva podrazreda: Eogastropoda i Orthogastropoda (Ponder i Lindberg, 2008), ali i dalje se najčešće koristi stara podjela na tri podrazreda prema stupnju torzije (Habdija i sur., 2011): prednjoškržnjaci (Prosobranchia), stražnjoškržnjaci

(Opistobranchia) i plućnjaci (Pulmonata). Tijekom embrionalnog razvoja došlo je do torzije utrobne vrećice i plaštanog kompleksa za 180°. Torzija predstavlja zajedničku karakteristiku svih puževa i rezultira drugačijim rasporedom unutrašnjih organa u puževa, a samim time omogućuje drugačiju podjelu puževa. Prije torzije, hipotetski oblik ima plaštanu šupljinu s pripadnim organima smještenu u stražnjem dijelu tijela. No, nakon torzije, koja se zbiva u dvije faze, plaštani kompleks prednjoškržnjaka je pomaknut naprijed pri čemu se par škrga smješta anteriorno, ispred srca (Zygobranchia), a zadržava obje pretklijetke (Diotocardia). U drugih prednjoškržnjaka, pomicanjem plaštanog kompleksa ulijevo zadržala se samo jedna škrga (Azygobranchia) i samo jedna pretklijetka (Monotocardia). S druge strane, kod stražnjoškržnjaka dolazi do određenog stupnja detorzije pa su se jedna škrga (Azygobranchia) i jedna pretklijetka (Monotocardia) u konačnici smjestile iza srca. Ova evolucijska pojava prisutna je i kod plućnjaka, samo što su kod njih škrge reducirane i zamijenjene spletom krvnih žila (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2004). Na ovaj način, torzijom se već tijekom embrionalnog i postembrionalnog razvoja puževima omogućuje uzimanje čiste vode potrebne za disanje. Isto tako, organi se smještaju u anteriorni položaj koji je povoljniji, upravo zbog smještaja osjetilnih organa koji su puževima od iznimnog značaja za svakodnevni život. Torziji prethodi razvoj vapnenačke ljušture koja evolucijskim razvojem mijenja oblik iz tanjurastog u stožasti, povećava svoj volumen te volumen utrobne vreće. S obzirom na veličinu i težinu, tijekom razvoja ljuštura se spiralno savija u bilateralno simetrično spiralnu kućicu koja je položena u jednoj ravnini s longitudinalnom osi tijela. U većine puževa jednodijelna spiralno savijena kućica se sastoji od različitog broja zavoja koji se nakon torzije usmjeruju prema stražnjem dijelu tijela. Posljednji zavoj je najveći i na njemu se otvara ušće koje u prednjoškržnjaka zatvara operkulum. To je rožnati poklopac koji izlučuje stražnji dio stopala. Operkulum je često očvrsnut kalcijevim karbonatom, a služi kao zaštita od predatora i isušivanja. Vrlo je koristan kopnenim puževima koji ne smiju izgubiti previše tekućine.

Na ventralnoj strani tijela nalazi se dobro razvijeno mišićno stopalo iz kojeg izlazi stopalni (tarzalni) mišić izgrađen od tankih, različito usmjerenih mišićnih vlakana, pričvršćen za vrh kućice. Njihovim stezanjem nastaju mišićne kontrakcije koje omogućuju savijanje i uvlačenje stopala u kućicu odnosno kretanje puževa. Uz tarzalni, puževima je izuzetno bitan kolumelarni mišić koji kontrakcijom mišićnih snopića uvlači organe u kućicu. Neki puževi na stopalu imaju bisusne žlijezde koje luče bisusne niti za pričvršćivanje za

podlogu odnosno mukozne žlijezde koje izlučuju sluz koja pomaže pri kretanju (Matoničkin i sur., 1998; Habdija i sur., 2004).

Tijelo puževa, osim glave i stopala, obavijeno je plaštom koji je uz kućicu prirastao uz rub, poput nabora. On se sastoji od vanjskog i unutarnjeg epidermalnog sloja. U kopnenih puževa je prokrvljen te ima funkciju dišne površine. Između plašta i utrobne vreće nalazi se plaštana šupljina koja obavija unutarnje organe dok se između plašta i unutarnje površine ljušture nalazi izvanplaštana (ekstrapalijalna) tekućina. Za život na kopnu puževi su se prilagodili brojnim osjetilima od kojih su od iznimne važnosti mehanička i kemijska osjetila smještena u koži. S druge strane, vodenim puževima su se dobro razvili kemoreceptori smješteni blizu osnovice škrga ili na rubu plašta. Hipotetski predak puža imao je bilateralno simetričan i tetraneuralan živčani sustav. Danas, kao posljedica torzije, živčani sustav puževa je asimetričan, sastavljen od pet pari ganglija: cerebralni, pedalni, pleuralni, visceralni i parijetalni (Matoničkin, 1998).

Prema vrsti hrane koju konzumiraju, u razredu puževa susrećemo grabežljivce, biljoždere, sveždere, strvinare i konzumente organskog detritusa. Prehrana puževa potpomognuta je specijaliziranim organom, radulom ili trenicom, smještenom na donjoj strani, u ždrijelu puževa. Trenica se sastoji od hitinske membrane sa središnjim, postranim i krajnjim zubićima smještenim u brojnim redovima, pričvršćenim na odontofor izgrađen od hrskavičnog tkiva (Matoničkin, 1998).

Puževi, kao i ostali mekušci, imaju otvoreni optjecajni sustav. Hemolimfa puževa je bezbojna ili u oksidiranom obliku plavkasta tekućina koja je od iznimne važnosti za prijenos hranjivih tvari, metaboličkih plinova i ekskreta. Isto tako, djeluje kao hidroskelet koji svojim turgorom omogućuje izvlačenje i uvlačenje tijela puža u vapnenačku ljušturu. Osmoregulacija i ekskrecija se vrši pomoću metanefridija te preko kože i škrga. Pritom se kod vodenih puževa u tijelu nakupljeni dušični ostaci odstranjuju u obliku amonijaka koji je topljiv u vodi, dok se kod kopnenih puževa stvara mokraćna kiselina koju izlučuju iz tijela u krutom stanju (Habdija i sur., 2011). Prednjoškržnjaci su većinom razdvojena spola te je kod njih evolucijskim razvitkom odnosno torzijom ostala jedna gonada koja se povezala s metanefridijima. Stražnjoškržnjaci i plućnjaci su dvospolci. Kod njih se razvila dvospolna žlijezda iz koje kroz dvospolnu cijev sjemenovodom i jajovodom putuju razvijene muške i ženske spolne stanice. Nakon oplodnje, koja može biti vanjska ili unutarnja, jaja prolaze fazu

gastrulacije kojom nastaje plivajuća ličinka trohofora koja sazrijevanjem prelazi u veliger ličinku koja u kasnijem stadiju prolazi proces torzije (Habdija i sur., 2011).

1.3. Biomineralizacijski procesi prisutni tijekom izgradnje kućice puža

Osnovni determinacijski kriterij za klasifikaciju slatkovodnih puževa su konhološke značajke, odnosno značajke kućice (Glöer, 2002). Kućice puževa su pretežito mineralnog porijekla izgrađene od tri sloja; vanjskog organskog sloja smeđe boje (periostrakum) te dva vapnenačka, srednjeg (oostrakum) i unutarnjeg (hipostrakum). Često se kod puževa ne razlikuju tri sloja nego se vapneni dio sastoji od tri, četiri pa i šest slojeva, kao što je to slučaj kod kopnenih puževa. Kućice sadrže visok udio kalcijevih i magnezijevih iona te su odraz fizioloških i okolišnih uvjeta. U sastavu kućice kristali kalcijeva karbonata zastupljeni su s više od 95 %. Kalcijev karbonat kristalizira u šest različitih polimorfa, pet je kristalično, a jedan je amorfni, koji se transformiraju u mnogo stabilnije polimorfe (Medaković i sur., 2015). Vaterit, kalcit i aragonit su najzastupljeniji „čisti" minerali koji se koriste za izgradnju čvrstih biomineralnih struktura (Čadež, 2015). Iako su i kalcit i aragonit sastavljeni od kalcijevog karbonata, njihove kristalne strukture se razlikuju. Kućica puža, slično kao i ljuštura školjkaša sastoji se od kalcijeva karbonata koji se u vanjskom sloju transformira u kalcit romboedarskog oblika dok se u unutarnjem sloju transformira u aragonit ortorombnog oblika. Aragonit ima bolje pakiranje jedinične ćelije, što mu omogućava veću otpornost na kalanje u usporedbi s romboedarnim kalcitom (Fricke i Volkmer, 2007; Weiner i Addadi, 1997). Isto tako, s obzirom na svoj rast, aragonit formira polimorfne strukture slične sitnim iglicama, dok kalcit formira velike (mono)kristaleromboedarnog oblika, koji su i više skloni kalanju. Ovakva svojstva aragonitu daju prednost kao građevnom materijalu pri formiranju guste i kompaktne kristalne rešetke (Nelyubina i Lyssenko, 2012). Prema Matoničkin i sur. (1998), uz kristale kalcijeva karbonata organski matriks sadrži organske komponente kao što su kalcijev fosfat, kalcijev sulfat, magnezijev karbonat te soli metala (aluminij, željezo, bakar, stroncij, barij). Mineralna slojevitost kućice posljedica je ugradnje metala, čiji su ioni različitog radijusa, u sloj kalcita i aragonita. Kalcitni sloj pogodan je za ugradnju iona manjeg radijusa od Ca, npr. Fe, Mn, Cu i Zn dok aragonitni sloj omogućava ugradnju iona Cd, Ba i Pb, većeg radijusa od Ca. Ovisno o uvjetima okoline, metali će se različito ugrađivati u slojeve. Ugradnja metala uključuje postupak biomineralizacije, taloženja i adsorpcije iz vode. Po završetku postupaka ugradnje metala, jedinke ne prolaze

reproduktivni ciklus i ne podliježu mehanizmima fiziološke promjene. Proces ugradnje je dugotrajan, za razliku od uklanjanja metala iz slojeva kalcita i aragonita kućice. Ovisno o vremenu sazrijevanja jedinka je podložna u kućicu integrirati veći broj metala, ovisno o uvjetima okoliša (Rončević i sur., 2010). Ovakav složeni biokemijski proces formiranja visoko organiziranih struktura poznatiji je pod nazivom biomineralizacija te se kao takav nalazi se pod kontrolom živih organizama (Cuif i sur., 2011; Lowenstam i Weiner, 1989; Marin i Luquet, 2007, Čadež, 2015).

Sastav kućice može biti pod utjecajem brojnih čimbenika iz okoliša te ovisiti o kompeticiji, parazitizmu, dostupnosti hrane i kalcijevih iona u staništu, tipu supstrata ili salinitetu (Bornancin i sur., 2017). Zbog kemijskog posredovanja u reguliranju ponašanja između vrsta dolazi do utjecaja na strukturu populacije, organizaciju zajednice i funkcije ekosustava. Samim time, kod određivanja taksonomije i sistematike puževa potrebno je uzeti u obzir navedene čimbenike (Bornancin i sur., 2017).

Istraživanjima kojima se ispituje stanje okoliša, upravo su metali oni koji su toksični i često nerazgradivi. Inkorporiraju se u kućicu te čine njen elementni sastav nepromjenjiv, bez obzira na fiziološke i okolišne uvjete koji služi poput elementnog „otiska prsta“ te vrste. Raznolikost staništa nekog područja usko je povezana s geografskim položajem, geološkim, klimatskim i hidrografskim uvjetima, razvedenosti reljefa te antropogenim utjecajima. Jedno područje ima niz prirodnih resursa: vodu, zrak i tlo. Osim što je filtar za mnoge štetne tvari, tlo sadrži velik broj kemijskih elemenata, posebice toksičnih. Elemente u tragovima tlo sadrži iz nekoliko izvora:

- litogeni/geogeni elementi koji su naslijeđeni iz litosfere (matična stijena),
- pedogeni elementi koji potječu iz litogenih izvora, ali su promijenjeni (u smislu specijacije) zbog pedogenetskih procesa i
- antropogeni elementi koji se talože na tlo ili prolaze kroz njega, a posljedica su aktivnosti čovjeka (Kabata-Pendias i Mukherjee, 2007; Halamić i Miko, 2009).

U litosferi Zemlje najzastupljeniji su elemenati: O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K i Mg. Navedeni elementi nalaze se u sastavu magmatskih stijena kore te čine 99 % njenog sastava. Pritom elementi Fe, O, Si i Mg grade 90 % kore, a elementi Ni, Ca, Al i S su zastupljeni s više od 1 %. U sastav ulaze još elementi Na, K, Cr, Co, P, Mn i Ti s udjelima od 0,1 do 1 % (Prohić, 1998).

Koncentracija toksičnih elemenata u tlu ovisi o: geološkoj podlozi, pedogenetskim, kemijsko–fizičkim i geomorfološkim čimbenicima. Ovisno o navedenim čimbenicima Republiku Hrvatsku možemo podijeliti na tri geomorfološka područja: panonsku, gorsku i primorsku Hrvatsku. Na tim područjima prevladavaju različiti klimatski faktori, ponajprije geološka podloga koji uvjetuju različite pedogenetske procese koji posredno utječu na geokemijski sastav tala, a samim time i na sastav kućice puževa (Halamić i Miko, 2009).

1.4. Slatkovodni puževi

Slatkovodni puževi zastupljeni su na svim kontinentima, na gotovo svim vodenim staništima, osim na Antarktici. Prema Dobrović (2015) u Europi je ukupno 856 vrsta slatkovodnih mekušaca, od čega 94 % čine slatkovodni puževi dok na području Hrvatske živi oko 200 vrsta slatkovodnih vrsta puževa (Habdija i sur., 2011). Specijalizirali su se za sve tipove staništa – vodenu vegetaciju, kamenje, stijene, drvo ili meki sediment. Slatkovodne ekosustave plitkih voda jezera, ribnjaka, rijeka, potoka i močvara ponajviše nastanjuju prednjoškržnjaci i plućnjaci. Slatkovodni puževi žive uglavnom na dnu, blizu ruba pitke vode dok se na većim dubinama, u jezerima i rijekama rijetko pojavljuju (Pfleger i Chatfield, 1988). Prednjoškržnjake možemo pronaći u tekućim vodama s puno kisika koji je od velike važnosti za njihov rast i razvoj, dok stajaće ili slabo tekuće vode zauzimaju plućnjaci koji do kisika dolaze penjući se na vodenu vegetaciju. Plućnjaci nemaju škrge nego kisik iz atmosfere uzimaju preko prokrvljenog plašta.

Prelazak puževa s mora na kopno ovisio je o mnogim ekološkim, abiotičkim i biotičkim čimbenicima: salinitetu, pH–vrijednosti, koncentraciji kalcijevih iona, količini otopljenog kisika, temperaturi, strujanju vode, supstratu, rastu bilja, kompeticiji za hranu, predatorima i parazitima (Glöer, 2002). Puževi su razvili sposobnost prilagodbe na stalne promjene u temperaturi, količini i strujanju vode u slatkovodnim ekosustavima što se suprotstavlja njihovim dosadašnjim uvjetima života u moru. Zastupljenost puževa u slatkovodnim ekosustavima varira ovisno o količini otopljenih kalcijevih soli, pH–vrijednosti, koncentraciji natrijeva klorida i temperaturi.

Povišena koncentracija kalcija u vodi uzrokuje njegovo veće taloženje u kućicu što za posljedicu ima veće i deblje kućice vrste koja se nalazi u takvim uvjetima te isto tako

povećan broj vrsta. Ovisno o ravnoteži između kalcijeva karbonata i ugljične kiseline nastale otapanjem ugljikova(IV) oksida u vodi doći će do njihove različite raspodjele što za posljedicu ima promjenu pH–vrijednosti vode. Ostali uvjeti koji utječu na život slatkovodnih vrsta puževa su temperatura vode i koncentracija natrijeva klorida. Prema dosadašnjim istraživanjima, slatkovodne vrste puževa ne zahtjevaju salinitet veći od 7 ‰ odnosno prilagodile su se uvjetima s niskom koncentracijom natrijeva klorida u vodi. Prema Glöer (2002) jedinke koje žive u vodi sa salinitetom 11 ‰ dosežu samo 70 % veličine kućice u usporedbi s onima koje žive u slatkoj vodi. Slatkovodne vrste puževa imaju različitu toleranciju na temperaturu.

Većina slatkovodnih puževa su bentoski puzači, mikroherbivorni i/ili mikroomnivorni strugači koji se hrane bakterijskim naslagama, algama i dijatomejama (Moog, 2002). Prema Lydeard i sur. (2004) slatkovodni mekušci predstavljaju jednu od najugroženijih skupina životinja. Kao glavni razlozi koji dovode do smanjenja broja vrsta i pada gustoće populacija ističu se njihov životni ciklus i antropogeni utjecaj (Strong i sur., 2008). Od značajki životnog ciklusa treba istaknuti da su vrste slabo pokretne, imaju ograničeni areal usko vezan za određeni tip staništa, nisku plodnost te samim time dugo vrijeme spolnog sazrijevanja i relativno dug životni vijek. Intenzivna poljoprivreda jedna je od glavnih antropogenih aktivnosti, a uključuje povećano korištenje raznih kemijskih gnojiva i pesticida, urbanizaciju, pretjerano korištenje i oblikovanje vodenih površina. Isto tako, na staništa utječu klimatske promjene popraćene povećanom učestalošću i intenzitetom suša te dolazi do unosa raznih invazivnih vrsta (Cuttelod i sur., 2011). Pod navedenim utjecajima, vrste se teško prilagođavaju na promjene u okolišu.

1.4.1. Slatkovodna vrsta *Holandriana holandrii*

Prema većini autora vrsta *H. holandrii* svrstana je u nadporodicu Cerithioidea odnosno porodicu Melanopsidae (Tablica 1). Odvajanje porodice Melanopsidae odvijalo se prije 10 i 8 milijuna godina, dok se odvajanje vrste *H. holandrii* odvilo prije oko 9,5 – 10,7 milijuna godina (Lovrenčić, 2015).

Tablica 1. Sistematski položaj vrste *H. holandrii* (Pfeiffer, 1828) prema www.faunaeur.org.

CARSTVO	Animalia
PODCARSTVO	Eumetazoa
KOLJENO	Mollusca
RAZRED	Gastropoda
PODRAZRED	Orthogastropoda
NADRED	Caenogastropoda
RED	Neotaenioglossa
NADPORODICA	Cerithoidea
PORODICA	Melanopsidae
ROD	*Holandriana*
VRSTA	*Holandriana holandrii* C. Pfeiffer, 1828

Slatkovodna vrsta *H. holandrii* ima kućicu čunjasto – jajastog oblika, žućkaste ili žućkasto zelene boje, s tri ili četiri crno – smeđe pruge (Slika 1). Kućica doseže visinu od 15 mm i širinu od 9 mm. Vrh kućice je širok, s četiri do šest konveksnih zavoja. Ušće je prozirno, jajastog oblika, veće visine nego širine. Unutrašnjost kućice je smeđa, kao i vanjski rub. U unutrašnjosti je vidljiva kolumela. Operkulum je relativno malen i zaobljen. Ovu slatkovodnu vrstu možemo naći u rijekama, potocima i jezerima gdje preferira čvrsti supstrat (kamenje, stijene, drvo).



Slika 1. Slatkovodna vrsta puža *H. holandrii* (C. Pfeiffer, 1828)

Prema IUCN kriterijima, svrstana je u kategoriju najmanje zabrinjavajuće vrste (LC, engl. *Last Concern)*. Isto tako, prema podacima AQEM baze, ova vrsta je dobar indikator okolišnog zagađenja (Tomović i sur., 2013), a često se koristi kao biomarker oksidativnog

stresa u okolišu (Vranković i sur., 2012). Bez obzira na vrlo veliku otpornost vrste uočeno je da se njena brojnost u nekim dijelovima Europe postupno smanjuje, no razlog tomu još nije poznat. Pretpostavlja se da se radi o nedostatku pogodnog supstrata, onečišćenju, ali i utjecaju invanzivnih vrsta (Tomović i sur., 2013). S obzirom na uočeno smanjenje brojnosti, vrsta je zaštićena u Mađarskoj, dok se u Sloveniji smatra osjetljivom vrstom (VU, engl. *Vulnerable*). Kao posljedica degradacije staništa, u Austriji je izumrla (Lovrenčić, 2015).

Na području Hrvatske vrstu *H. holandrii* nalazimo u većini rijeka crnomorskog slijeva (Dunav, Sava, Drava, Kupa, Mrežnica, Korana, Dobra, Lonja, Ilova i dr.) dok ju u jadranskom slijevu nalazimo samo u rijeci Cetini (Habdija i sur., 1995). U Srbiji ova vrsta je rasprostranjena u većem broju rijeka. Dominantna je u rijekama i potocima male do srednje veličine, nadmorske visine do 500 m, sa supstratom kojeg čine kamenje različite veličine i šljunak. Zabilježena je u sljedećim rijekama: Kačer, Ljig, Toplica, Kolubara, Jadar, Lim, Drina, Kamenica, Resava, Trgoviški, Beli i Crni Timok, Vlasina i Nišava (Tomović i sur., 2013).

1.5. Atomska spektroskopija

Metode atomske spektroskopije predstavljaju skup metoda koje se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu elementnu analizu uzoraka različitog porijekla. Navedene metode temelje se na mjerenjima pojava emisije, apsorpcije i fluorescencije. Iako su takve metode vrlo osjetljive, imaju i niz prednosti; brzina, prikladnost, visoka selektivnost i umjerene cijene instrumenata. Ovim metodama se informacije o kemijskom sastavu dobivaju iz atomskih spektara u optičkom dijelu elektromagnetskog spektra zračenja. Optički dio spektra predstavljaju ultraljubičasti (UV), vidljivi (VIS) i bliski infracrveni (NIR) dio s frekvencijama koje su energijski prikladne za pobuđivanje elektrona (Skoog i sur., 1999).

Razvojem znanosti o atomskoj spektroskopiji razvile su se tri tehnike za analitičku primjenu:

- Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS)
- Atomska emisijska spektrometrija (AES)
- Atomska fluorescencijska spektrometrija (AFS)

1.5.1. Atomska emisijska spektrometrija

Metode atomske emisijske spektrometrije primjenu su našle u kvantitativnoj analizi različitih elemenata u uzorcima. U kratkom vremenskom periodu određuju se elementi zastupljeni u tragovima do onih zastupljenih u velikim koncentracijama. Kao posljedica emitiranja zračenja različitih valnih duljina pobuđenih atoma pri povratku u osnovno stanje nastaju atomski spektri. Metode atomske spektrometrije prvenstveno se primjenjuju za kvantitativne, a potom i kvalitativne analize. Kvantitativnom analizom koja je povezana s količinom emitiranog zračenja dobivamo informacije o sadržaju analita dok kvalitativnom analizom dobivamo informacije o vrsti analita u uzorku.

Metode atomske emisijske spektrometrije temelje se na tri koraka: atomizaciji uzorka, pobuđivanju i emisiji. Atomizacijom u visokotemperaturnim izvorima nastaju pobuđeni slobodni ioni i/ili atomi. Pobuđeno stanje je nestabilno stoga se atomi vraćaju u

osnovno stanje emitirajući pritom zračenje određenih valnih duljina odnosno energiju u obliku topline ili radijativno.

1.6. Atomska emisijska sprektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES)

Metoda ICP-AES koristi plazmu kao izvor pobudnog zračenja. Izvor induktivno spregnute plazme sastoji se od plamenika kojeg čine tri koncentrične kvarcne cijevi (vanjska, središnja i unutarnja). Pri vrhu plamenika, oko središnje cijevi vidljiva je bakrena zavojnica hlađena vodom. Zavojnicu napaja radiofrekvencijski generator. Njegovim djelovanjem na zavojnicu, slobodni elektroni plina nosioca dolaze u interakciju s magnetskim poljem te na taj način inertni plin postaje električno vodljiv. Nastala interakcija uzrokuje prstenasto kretanje iona i elektrona u prostoru zavojnice pri čemu dolazi do nastanka energije koju prepoznajemo po intenzivnom zagrijavanju plina. Lančanom reakcijom sudara elektrona s atomima argona u području zavojnice stvara se induktivno spregnuta plazma. Najčešće se u ovu svrhu upotrebljava plin argon.

Argon je kemijski inertan, monoatomni element, visoke ionizacijske energije (15,76 eV) koji slabo provodi toplinu. Zbog svoje kemijske inertnosti eventualno nastale kemijske vrste u uzorku su vrlo nestabilne i najčešće disociraju odmah nakon relaksacije u stanje niže energije. Isto tako, zbog smanjenog utjecaja pozadinskog zračenja daje jednostavan emisijski spektar koji ne utječe na analitičku osjetljivost instrumenta ICP-AES, za razliku od molekulskog emisijskog spektra dobivenog u izvoru plamena (Marciuš, 2017).

Nastala plazma nalikuje na plamen, intenzivne, bijele boje. Središnja jezgra proizvodi spektralni kontinuum koji je rezultat kombinacije plina argona te drugih iona s elektronima. Spektralna mjerenja se provode u području iznad zavojnice gdje je najmanji utjecaj argonovih linija. Temperatura plazme je vrlo visoka pa se vanjski plašt plamenika hladi tangencijalnim protokom argona. Ovakav izvor ima za posljedicu nekoliko prednosti: atomizacija nastaje u inertnoj okolini plina argona što produžuje vrijeme života uzorka, temperaturni presjek plazme je jednoličan, a tako dobivene baždarne krivulje su linearne za nekoliko redova veličine koncentracije.

Prema Nölte (2003) postoji pet temperaturnih područja plazme:

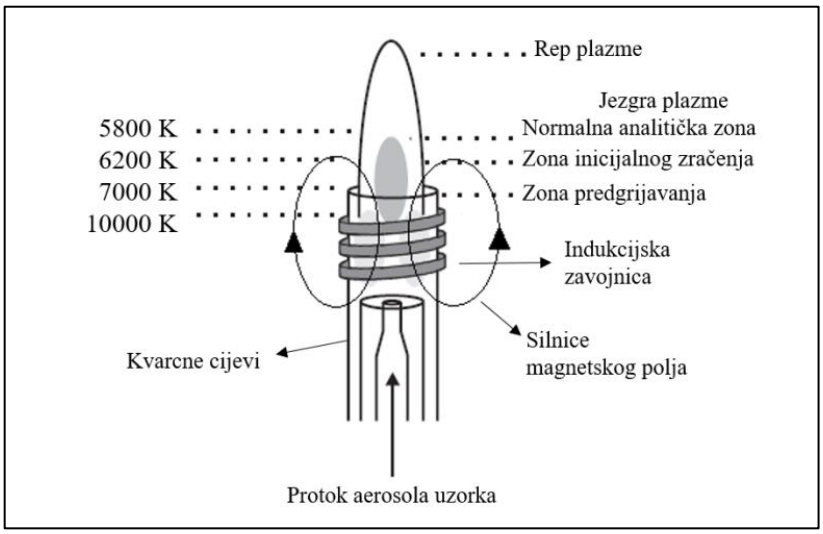
1. Zona predgrijavanja – konačno uklanjanje otapala uzorka;

2. Visokotemperaturna jezgra – dolazi do procesa razgradnje, isparavanja i atomizacije uzorka;

3. Zona inicijalnog zračenja – kontinuum blijedi i plazma postaje optički prozirna;

4. Normalna analitička zona – najmanji utjecaj pozadinskog zračenja, pogodno za mjerenje intenziteta emisije analita

5. Niskotemperaturni rep plazme – pobuda elemenata s niskom energijom pobude (Slika 2)



Slika 2. Dijelovi i temperaturna područja induktivno spregnute plazme

1.6.1. Instrumentacija

Instrument za ICP-AES kemijsku analizu sastoji se od: sustava za uvođenje uzorka, plamenika, radiofrekvencijskog generatora te spektrometra i detektora.

Uzorak se unosi u vruću plazmu pomoću protoka argona kroz središnju kvarcnu cijev. Otopina uzorka kapilarom ulazi u raspršivač koji potom tekući uzorak provodi u aerosol i transportira u plazmu. Prilikom raspršivanja otopine dolazi do zaostajanja velikih

čestica aerosola koje se uklanjaju u komori za raspršivanje. Smještena je između raspršivača i plamenika.

Način prikupljanja signala u plazmi ovisi o položaju plamenika koji može biti aksijalan i radijalan. Na aksijalan način analitičku zonu promatramo s vrha plazme čime prikupljamo zračenje većeg intenziteta koje prolazi duž cijele osi plazme. Ovakav položaj ima za posljedicu veću analitičku osjetljivost i veći utjecaj pozadinskog zračenja te spektralnih i ionizacijskih interferencija. No, ovim položajem se smanjuje analitička osjetljivost za analizu elemenata u tragovima. S druge strane, radijalno promatranje omogućuje mjerenje emisije zračenja na točno određenoj visini. Ovakvim načinom mjerenja smanjene su spektralne interferencije i pozadinsko zračenje te je omogućeno mjerenje većine elemenata (Toth, 2016).

Povratkom atoma i iona iz pobuđenog u osnovno stanje niže energije dolazi do emitiranja zračenja određene valne duljine. Kako bi se poboljšala kvaliteta i ubrzala spektralna analiza, danas su u mjerenju primjenu našli ešeletni spektrometri. Nastali su kombinacijom dva disperzijska elementa, najčešće ešeletne rešetke i prizme. Na ovaj način, kombinacijom dva disperzna elementa moguća je detekcija više spektralnih redova u obliku dvodimenzionalne slike koja se nazova ešelogram. Korištenjem ešeletnog spektrometra dobiven je niz prednosti od kojih se ističu visoka efikasnost mjerenja signala u svim spektralnim redovima te iznimno razlučivanje linija u visokim spektralnim redovima.

Izdvojene emisijske linije u spektrometru šalju se na detektore koji prikupljaju signal i mjere intenzitet emisijskih linija. Danas, prema Kobelja (2016) za detekciju se koriste detektori u čvrstom stanju, na bazi silicija. Uslijed narinutog električnog polja dolazi do gibanja elektrona i nastalih šupljina u kristalnoj strukturi prema sloju Si-SiO_2 te stvaranju struje koja je proporcionalna količini fotona koja prodire u kristal. Dobiveni signal s detektora dolazi na procesor signala koji pojačava i filtrira električni signal od neželjenih interferencija - šumova.

Obrada analitičkih podataka vrši se pomoću računalnog programa računala na kojeg je spojen ICP-AES uređaj. Pomoću računala moguće je mjeriti i kontrolirati sljedeće parametre: brzinu protoka argona, volumen uzorka, položaj plamenika, snagu radiofrekvencijskog generatora, razmještaj leća i zrcala u spektrometru te ukloniti interferencije i pozadinsko zračenje. Danas, moderni instrumenti određuju kalibracijsku funkciju automatski metodom najmanjih kvadrata i izračunavaju koncentraciju. Ona nam

predstavlja značajnu informaciju, prikupljeno zračenje na detektoru, prevedeno u električni signal u računalu.

1.6.2. Analitičke značajke induktivno spregnute plazme

Ovisno o radnim parametrima, može doći do promjena u intenzitetu analitičkog signala odnosno do kemijskih, fizikalnih i spektralnih interferencija. Između određivanih i ostalih prisutnih elemenata u uzorku dolazi do kemijskih interakcija koje uključuju ionizacijske efekte i efekt isparavanja otapala. S druge strane, fizikalne interferencije su povezane s promjenom fizičkih svojstava uzorka. Kemijske i fizikalne interferencije ne uzrokuju značajne promjene u metodi ICP-AES. S druge strane, spektralne interferencije su izraženije u ICP-AES metodi. Na smanjenje spektralnih interferencija se može utjecati: odabirom druge, pogodnije emisijske linije koja je slobodna od interferencija, primjenom metoda odvajanja analita iz matrice prije analize (ekstrakcija, ionska izmjena, itd.), korekcijom pozadinskog zračenja i zalutalog zračenja te upotrebom kvalitetnijih optičkih komponenata (Hill, 2007).

1.7. Određivanje metala u biološkim uzorcima

Metali su u vodama i otopinama bioloških uzoraka zastupljeni u tragovima, u obliku anorganskih i organskih spojeva. Za određivanje njihovih koncentracija primjenjuju se različite metode poput elektrokemijskih tehnika i odgovarajućih spregnutih tehnika atomske apsorpcijske ili emisijske spektrometrije. Analiza metodom ICP-AES provodi se u otopinama uzoraka. Pritom su u takvim otopinama prisutne velike koncentracije vode, organskih spojeva, kiselina i soli koje mogu utjecati na analitički signal. Najveći utjecaj na čistoću analitičkog signala imaju alkalijski i zemnoalkalijski metali ukoliko su u matrici prisutni u koncentracijama većim od 0,05 mol L^{-1} (Kobelja, 2016). U geološkim uzorcima vapnenačkog porijekla kalcij je sastavni dio. Koncentracija kalcija u uzorcima vapnenca je stalno promjenjiva zbog ionske izmjene magnezijevih i željezovih iona sa ionima kalcija u strukturi.

Za određivanje koncentracija metala i polumetala akumuliranih u mekom tkivu i ljušturi školjkaša, najčešće se primjenjuje atomska apsorpcijska spektrometrija (engl. *atomic absorption spectrometry*, AAS) uz elektrotermičku atomizaciju, tehnike atomske emisijske spektrometrije temeljene na plazmi, kao i tehnika rentgenske flourescencije koja je nedestruktivna tehnika te se koristi direktno na uzorku liofiliziranog tkiva ili ljušture.

U kalcitnom skeletu ljušture najčešće su zastupljeni sljedeći metali: kalcij, magnezij, stroncij, barij i mangan, a metali u tragovima poput bakra, kadmija, kroma, olova, cinka, nikla, kobalta, željeza i žive, obzirom na radijuse iona ugrađuju se u slojeve kalcita (Fe, Mn, Cu, Zn) i aragonita (Cd, Ba, Pb) kroz dulje vremensko razdoblje.

1.7.1. Ciljevi istraživanja

- odrediti i usporediti morfometrijske značajke kućica slatkovodne vrste *H. holandrii* sa svakog pojedinog lokaliteta
- metodom ICP–AES odrediti sadržaj glavnih elemenata, elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu te elemenata u tragovima u sastavu kućica slatkovodne vrste *H. holandrii*
- usporediti kemijski sastav kućice s već poznatom geološkom podlogom vodotoka

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja

Geomorfološki se Republika Hrvatska može podijeliti u tri područja koja imaju svojstvena klimatska i hidrološka obilježja. To su panonska, gorska i primorska Hrvatska. Prema Halamić i Miko (2009) teritorij Republike Hrvatske podijeljen je na pet geografskih cjelina odnosno regija. U panonskom prostoru izdvojene su Središnja Hrvatska, Posavina i Podravina. Regija Gorska Hrvatska pokriva područje Gorskog kotara i Like, a Primorska Hrvatska područje Istre, Primorja i Dalmacije.

U ovom diplomskom radu ukupno je analizirano osam populacija, šest iz Hrvatske (Cetina – Zadvarje, Una – Kozi Brod, Maja – Dolnjaki, Korana – Markovići, Kupa – Ozalj i Sutla – Ključ Brdovečki) i dvije iz Srbije (Drina – Banja Koviljača, Nišava – Prosek) (Tablica 2). Svi lokaliteti na području Hrvatske nalaze se na području Središnje Hrvatske, a izuzetak je rijeka Cetina koja se nalazi na području Dalmacije.

Tablica 2. Lokaliteti i datumi uzorkovanja vrste *H. holandrii*

Broj lokaliteta	Vodotok	Lokalitet	GPS KOORDINATE		Datum uzorkovanja
			N	E	
1	Cetina	Zadvarje	43º 25' 54,54"	16º 52' 39,71"	13.11.2010.
2	Una	Kozi Brod	45º 9' 20,64"	16º 28' 11,04"	30.8.2014.
3	Maja	Dolnjaki	45º 17' 46,83"	16º 7' 47,95"	30.8.2014.
4	Korana	Markovići	45º 19' 30,5"	15º 31' 11,6"	3.7.2008.
5	Kupa	Ozalj	45º 36' 53,10"	15º 28' 47,02"	9.5.2015.
6	Sutla	Ključ Brdovečki	45º 52' 24,68"	15º 41' 7,76"	13.11.2010.
7	Drina	Banja Koviljača	44º 31' 20,3"	19º 09' 26,1"	9.8.2016.
8	Nišava	Prosek	43º 18' 27,7"	22º 01' 55,2"	10.8.2016.

Puževi su metodom slučajnog odabira ručno prikupljeni u razdoblju od 2008. do 2016. godine, konzervirani u 75 %–tnom etanolu te dopremljeni u laboratorij Zoologijskog zavoda.

2.2. Laboratorijska obrada uzoraka

Iz svake istraživane populacije nasumično je odabrano 30 adultnih jedinki. Svaki uzorak je temeljito i pažljivo očetkan kako se ne bi oštetio površinski sloj kućice. Nakon toga su provedena mjerenja šest morfometrijskih značajki: visina kućice, širina kućice, visina ušća, širina ušća, visina zavojnice i visina posljednjeg zavoja. Za mjerenja je korištena digitalna pomična mjerka s točnošću mjerenja 0,01 mm. Nakon toga je iz svake populacije odabrano 10 jedinki kojima je iz kućice izvađeno mekano tijelo. Tkivo je pohranjeno za potrebe daljnjih bioloških istraživanja u epruvete s 96 %-tnim etanolom. Prazne kućice puževa stavljene su u Petrijeve zdjelice i ostavljene na sušenju na sobnoj temperaturi 24 sata. Nakon toga je masa svake kućice izvagana na digitalnoj vagi s točnošću mjerenja 0,001 g. Uzorci kućica stavljeni su u epruvete koje su označene brojem vrste i nazivom lokaliteta te su dopremljene u Laboratorij za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta gdje je provedena analiza kemijskog sastava kućica.

Kratice morfometrijskih značajki koje su korištene u daljnjem tekstu prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Objašnjenje kratica korištenih u morfometrijskim mjerenjima

KRATICA	ZNAČAJKA
VK	visina kućice
ŠK	širina kućice
VU	visina ušća
ŠU	širina ušća
VZ	visina zavojnice
VPZ	visina posljednjeg zavoja
M	masa

2.3. Kemijska analiza

Iz svake populacije odabrano je deset kućica. Za kemijsku analizu korištene su sljedeće kemikalije:

- Destilirana deionizirana voda, Milli-Q Element 18 system (Millipore, USA)
- Dušična kiselina, *Suprapure* (Merck, Darmstadt, Germany)
- Vodikov peroksid (Kemika, Zagreb, Croatia)
- Jednoelementne standardne otopine metala Ba, Ca, K, Mg, Na (Merck, Darmstadt, Germany)
- Multielementna standardna otopina (ICP multi – element solution IV, Merck, Darmstadt, Germany)
- Certificirani materijali korištenu za kemijsku analizu su:
- SRM 1d (engl. *argillaceous limestone*), uzorak glinenog škriljevca, Standard Reference Materijal, National Institute od Standards and Technology
- SRM 88b (engl. *dolomitic limestone*), uzorak dolomitske stijene, Standard Reference Materijal, National Institute od Standards and Technology

Instrumenti korišteni za kemijsku analizu bili su sljedeći:

- Mikrovalna pećnica MWS-2 Microwave System Speedware (Berghof, Eningen, Germany)
- Atomski emisijski spektrometar uz induktivno spregnutu plazmu *Prodigy High Dispersion ICP* (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA)

2.4. Priprema uzoraka za analizu

Razlomljeni uzorci kućice puževa ručno su usitnjeni u vrećicama u porculanskom tarioniku te potom u ahatnom tarioniku do sitnog, sivo bijelog praha. Praškasti uzorak prenesen je u epruvete odnosno posudice i snažnim protresanjem dodatno homogeniziran. Za potrebe daljnje analize, korišteni su uzorci pet jedinki sa svakog lokaliteta te teflonske posude koje su prethodno isprane destiliranom vodom i sa 100 mL 50 % HNO_3 te podvrgnuti

zagrijavanju u mikrovalnoj pećnici MWS-2 Microwave System Speedware (Berghof, Eningen, Germany).

Teflonske posude imaju visoku radnu temperaturu (260 °C) i tlak (60 - 100 bara) sa sigurnosnim ispustom za paru, smještenim u rotoru mikrovalne pećnice pod visokim tlakom, čime se postiže jednoliko zagrijavanje, skraćuje vrijeme razgradnje i koristi minimalan volumen kiseline (Kobelja i sur., 2016).

Odvaga uzorka od 250 mg sa svakog pojedinog lokaliteta precizno je prenesena u teflonske posude. U svaku teflonsku posudu uzorcima je dodano 8 mL HNO_3, *Suprapure* (Merck, Darmstadt, Germany) te 1 mL H_2O_2 (Kemika, Zagreb, Croatia). Prilikom ovakvog procesa razgradnje razvija se velika količina dušikovog(II) oksida. Vodikov peroksid se dodaje za smanjenje količine dušikovog(II) oksida i tlaka u teflonskoj posudi te za poboljšanje učinkovitosti razgradnje. Prije razgradnje teflonske posude zajedno sa sadržajem ostavljene su 30 minuta otvorene. Mikrovalna razgradnja uzoraka odvila se u tri koraka (uvjeti: 120 °C/15 min, 180 °C/15 min, 100 °C/10 min). Teflonske posude s uzorcima ostavljene su da se ohlade na sobnoj temperaturi. Dobivene bistre otopine pažljivo su prenesene u odmjerne tikvice od 25 mL. Razgrađeni uzorak kvantitativno je prebačen u odmjerne tikvice pomoću staklenog lijevka. Odmjerne tikvice dopunjene su destiliranom deioniziranom vodom do oznake. Metodom mokre razgradnje potpomognute mikrovalnom pobudom omogućena je kontrola tlaka i temperature, čime se postižu precizni i ponovljivi uvjeti razgradnje i ekstrakcije.



Slika 3. Analitička obrada uzoraka

2.5. Mjerni postupci

Kako bi se provjerila jasnoća analitičkog signala kemijska analiza započinje mjerenjem intenziteta emisije slijepe probe, otopine koja sadrži razrijeđenu kiselinu (dušičnu kiselinu). Otopine za kalibraciju pripremljene su razrjeđenjem s 2 % HNO_3. Pritom su korištene jednoelementne standardne otopine metala Ba, Ca, K, Mg, Na (Merck, Darmstadt, Germany) od kojih su pripremljene otopine za kalibraciju od 0 mg L^{-1}, 0,5 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1} i 20 mg L^{-1} te multielementna standardna otopina od koje su pripremljene otopine za kalibraciju, od 0 mg L^{-1}, 0,2 mg L^{-1}, 0,5 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1}, 1,0 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1} i 20 mg L^{-1}.

Dodatkom kiseline u otopine uzoraka i u standardne kalibracijske otopine smanjio se utjecaj matrice koji utječe na analitičku osjetljivost metode. Pojedini elementi su u matrici uzorka zastupljeni u većoj koncentraciji. Njihove spektralne linije prekrivaju linije elementa od interesa stoga je potrebno u otopinu uzorka dodati poznatu koncentraciju standardne otopine elementa od interesa. Standardne otopine korištene tijekom analize moraju po sastavu biti što sličnije uzorku. Otopine uzoraka su zbog velike količine soli i visokih

intenziteta za alkalijske i zemnoalkalijske elemente razrijeđene deset odnosno 200 i 400 puta, prije mjerenja.

Zbog sličnog elementnog sastava s mjerenim uzorcima, a u svrhu određivanja točnosti analitičkog postupka priprave i mjerenja u kemijskoj analizi korišteni su referentni uzorci SRM 1d (engl. *argillaceous limestone*), uzorak glinenog škriljevca i SRM 88b (engl. *dolomitic limestone*), uzorak dolomitske stijene.

Tablica 4. Detekcijske granice (μg L^{-1}) za standardnu kalibraciju i kalibraciju uz dodatak standardne otopine kalcija (35 mg L^{-1})

Element	**λ / nm**	**Standardna kalibracija (R^2)**	**c_L / μg L^{-1}**	**Kalibracija uz dodatak Ca (R^2)**	**c_L (Ca $_{dod}$)/ μg L^{-1}**
Ag	328,068	0,99998	1,8	0,99999	1,9
Al	396,152	0,99994	3,8	0,99993	11,1
B	249,677	0,99998	5,0	0,99984	17,9
Ba*	455,403	0,99995	1,2	0,99995	1,7
Cd	214,441	0,99999	0,4	0,99989	0,6
Co	236,379	0,99999	1,3	0,99992	3,4
Cr	205,552	0,99999	2,4	0,99992	2,5
Cu	324,754	0,99998	1,3	0,99991	1,7
Fe	259,940	0,99999	0,8	0,99994	6,1
K	766,491	0,99351	3,0	0,99984	6,3
Li*	670,784	0,99993	9	0,99999	0,3
Mg*	279,553	0,99988	0,2	0,99997	0,3
Mn	257,610	0,99996	0,3	0,99999	0,3
Na	589,592	0,99963	3,8	0,99900	4,9
Ni	221,648	0,99999	2,1	0,99991	2,8
Pb	220,353	0,99998	6,4	0,99989	13,1
Sr*	421,552	0,99999	0,3	0,99996	0,4
Zn	206,201	0,99999	0,3	0,99991	1,4

* elementi snimljeni u radijalnom položaju plamenika

2.6. Značajke instrumenta

Za elementnu analizu uzoraka slatkovodne vrste *H. holandrii* korišten je optički emisijski spektrometar *Prodigy High Dispersion ICP* (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA; Slika 4). Instrument je opremljen s radiofrekvencijskim generatorom (40 MHz, tip "free-running") i spektrometrom koji sadrži ešeletnu rešetku te L-PAD detektor (engl. *large-format programmablearray detector*). Brzina protoka otopina uzorka ugođena je na 0,9 mL min^{-1}, dok je snaga generatora bila ugođena na 1,3 kW. Brzina protoka argona iznosila je: glavni protok 18 L min^{-1} te pomoćni protok 0,8 L min^{-1}. Pomoću L-PAD detektora snimljeni su položaji odabranih emisijskih linija. Vrijeme prikupljanja analitičkog signala iznosilo je 10 s uz tri ponavljanja. Preciznost mjerenja intenziteta na odabranim emisijskim linijama, postignuta je u rasponu od 0,1-1,7 % RSD.



Slika 4. Optički emisijski spektrometar *Prodigy High Dispersion ICP* (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA)

2.7. Statistička obrada podataka

Za grafičku i statističku obradu podataka korišten je program Microsoft Office Excel 2010 i 2013 te programski paketi Statistica 13 i SPSS 21.

2.7.1. Morfometrijska analiza

Podaci dobiveni mjerenjem morfoloških značajki opisani su pomoću standardne deskriptivne statistike. Kako bi se isključila individualna razlika u veličini jedinki, na osnovu morfometrijskih mjerenja izračunati su slijedeći omjeri: VK/ŠK, VU/ŠU, VU/VK, ŠU/ŠK, VU/ŠK, M/VK (za objašnjenje kratica pogledati Tablicu 3). Metodom Tukey box plot prikazani su rezultati morfometrijskih mjerenja i njihovih omjera za sve istraživane lokalitete.

Kako bi se utvrdilo da li su morfometrijske razlike između lokaliteta statistički značajne provedena je analiza morfometrijskih omjera Kruskal-Wallis testom (p = 0,05). Povezanost serija morfoloških podataka utvrđena je na osnovu Pearsonovog koeficijenta korelacije koji je korišten za utvrđivanje linearne povezanosti pri normalnoj distribuciji analiziranih podataka. Kod interpretacije rezultata korelativne povezanosti korištena je skala prikazana u Tablici 5 prema Hopkins (2000).

Tablica 5. Prikaz skale interpretacije korelacija prema Hopkins (2000)

Koeficijent korelacije (r)	Opis korelacije
0.0-0.1	trivijalna, vrlo mala, nebitna, malena, praktički nula
0.1-0.3	mala, niska, manja
0.3-0.5	umjerena, srednja
0.5-0.7	velika, visoka, glavna
0.7-0.9	vrlo velika, vrlo visoka, izrazita
0.9-1	gotovo ili praktično: savršena, potpuna, beskonačna

2.7.2. Kemometrijska analiza

Za potrebe kemijske analize dobivene koncentracijske vrijednosti pojedinih elemenata prevedene su u logaritamske vrijednosti.

Dobiveni rezultati podvrgnuti su multivarijatnoj analizi odnosno analizi glavnih komponenata (PCA). Multivarijatnom analizom mjeri se veći broj međusobno povezanih varijabli na više uzoraka. Navedena metoda pripada skupini kemometrijskih metoda, odnosno skupini statističkih metoda obrade eksperimentalnih podataka koje su svoju primjenu našle u kemiji (Pećina, 2006). Korelacijska matrica multivarijatne analize izvedena je iz 18 stupaca koji predstavljaju varijable (kemijske elemente) te osam redaka koji predstavljaju lokalitete na kojima su kućice puževa uzorkovane. Varijable su predstavljale mjerenu koncentraciju kemijskih elemenata čije su vrijednosti autoskalirane i logaritmirane po bazi deset.

Isto tako, mjerene koncentracije kemijskih elemenata podvrgnute su klaster analizi. Ova statistička metoda također pripada multivarijatnim tehnikama. U statističkoj obradi podataka je korištena hijerarhijska, aglomerativna klaster analiza. Za razvoj klastera korištena je metoda pojedinačne vezanosti (engl. *Single Linkage*). Prema Pećina (2006) navedena metoda računa minimalnu udaljenost između svih mogućih parova opažaja, u ovom slučaju mjerenih koncentracija kemijskih elemenata na pojedinom lokalitetu, u dva klastera. Dobiveni rezultati korištene metode analize prikazani su grafički, dendogramom.

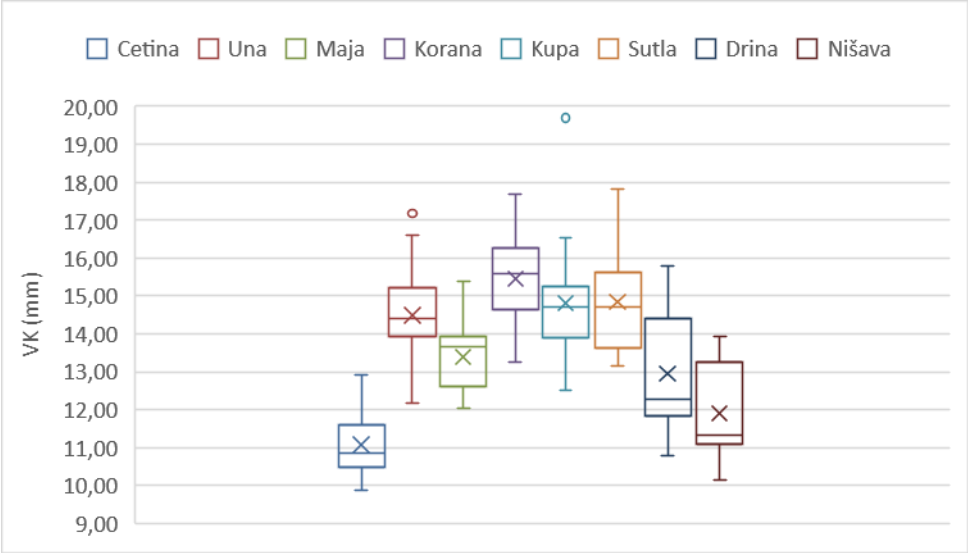
3. REZULTATI

3.1. Rezultati morfometrijske analize

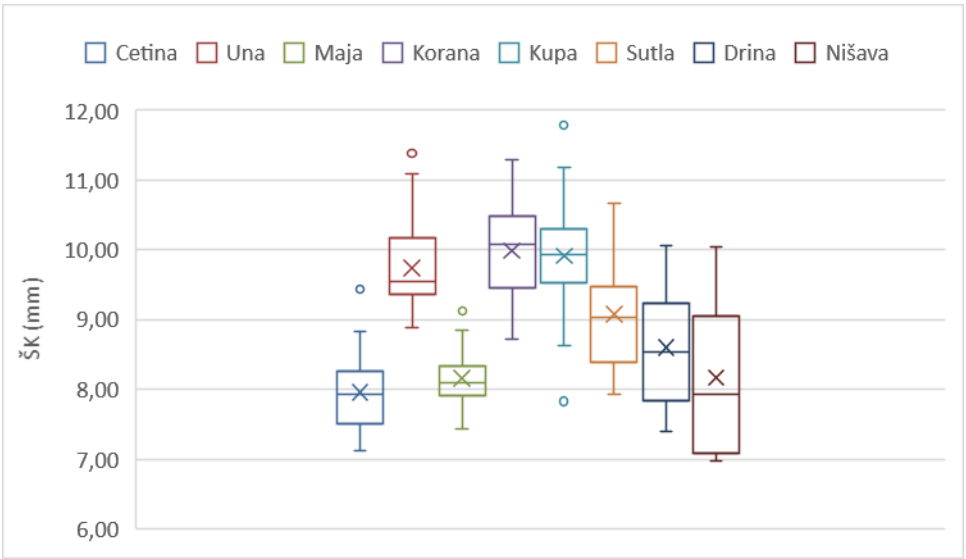
Rezultati morfometrijskih mjerenja pokazali su da je jedinka s najvećom visinom kućice (VK = 19,69 mm), širinom kućice (ŠK = 11,79 mm), visinom ušća (VU = 11,46 mm), visinom zavojnice (VZ = 8,23 mm) i najvećom masom kućice (M = 0,49 g) uzorkovana u Kupi. Jedinka s najvećom širinom ušća (ŠU = 8,97 mm) pronađena je u Korani, dok je jedinka s najvećom visinom posljednjeg zavoja (VPZ = 14,15 mm) uzorkovana u Uni.

Srednje vrijednosti svih mjerenih morfoloških značajki kućice prikazane su na Slikama od 5 do 11 i u Tablici I (u Prilogu). Najniže srednje vrijednosti svih značajki utvrđene su kod jedinki iz Cetine (VK = 11,08 ± 0,82 mm; ŠK = 7,96 ± 0,52 mm; VU = 7,39 ± 0,50 mm; ŠU = 6,01 ± 0,92 mm; VZ = 3,69 ± 0,53 mm; VPZ = 9,84 ± 0,71 mm; M = 0,18 ± 0,05 mm) dok su najviše srednje vrijednosti visine i širine kućice, visine ušća i visine zavojnice zabilježene kod jedinki iz Korane (15,45 ± 1,09 mm; 9,99 ± 0,66 mm; 9,20 ± 0,67 mm; 6,24 ± 0,71 mm; slijedom navođenja). Najviše srednje vrijednosti širine ušća, visine posljednjeg zavoja i mase (7,46 ± 0,87 mm; 12,71 ± 1,15 mm 0,39 ± 0,05 mm, slijedom navođenja) utvrđene su kod jedinki uzorkovanih u Kupi .

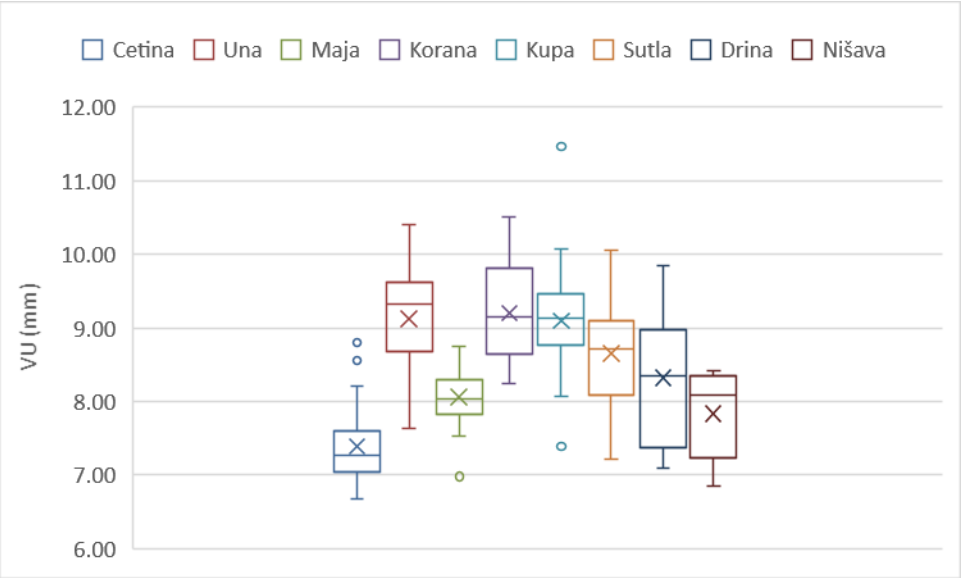
Promatrajući vrijednosti omjera (Slike 12 do 17; Tablica I, u Prilogu), vidljivo je da najveću srednju vrijednost omjera visine i širine kućice (VK/ŠK = 1,64 ± 0,11) te visine ušća i širine kućice (VU/ŠK = 0,99 ± 0,05) imaju jedinke iz Maje, dok najmanju srednju vrijednost omjera visine i širine kućice imaju jedinke iz Cetine (VK/ŠK = 1,39 ± 0,06) odnosno najmanji omjer visine ušća i širine kućice jedinke iz Kupe (VU/ŠK = 0,92 ± 0,04). Jedinke uzorkovane u Korani imale su najveću srednju vrijednost omjera visine i širine ušća (VU/ŠU =1,32 ± 0,14), dok je ta vrijednost bila najmanja kod jedinki iz Kupe (VU/ŠU = 1,23 ± 0,13). Analizirajući omjer visine ušća i visine kućice najveća srednja vrijednost utvrđena je za jedinke iz Cetine (VU/VK = 0,67 ± 0,03), a najmanja za one iz Sutle (VU/VK = 0,58 ± 0,03). Jedinke uzorkovane u Korani imaju najmanju srednju vrijednost omjera širine ušća i širine kućice (ŠU/ŠK = 0,71 ± 0,08), dok je najveća srednja vrijednost ovog omjera utvrđena jedinkama iz Nišave (ŠU/ŠK = 0,79 ± 0,04). Najveću srednju vrijednost omjera mase i visine kućice imale su jedinke iz Kupe (M/VK = 0,026 ± 0,003), a najmanju one uzorkovane u Maji (M/VK = 0,014 ± 0,002).



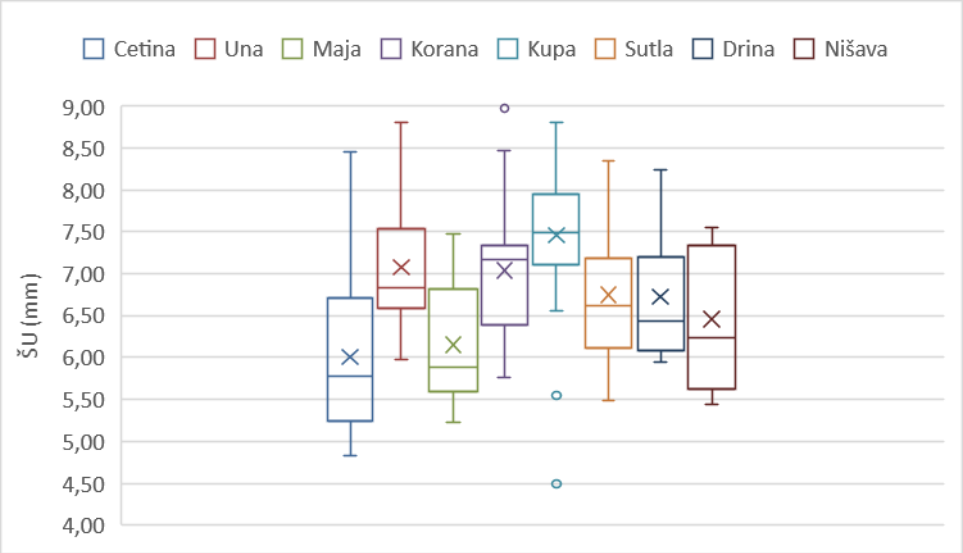
Slika 5. Vrijednosti visine kućice (VK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (pravokutnik - podaci od donjeg do gornjeg kvartila; crta po pravokutniku – medijan; x - aritmetička sredina, srednja vrijednost; donje i gornje horizontalne linije, „whisker"- najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1.5 puta interkvartilnog raspona gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila; kružić, „outliner" - točke vrijednosti koje odudaraju od ostalih)



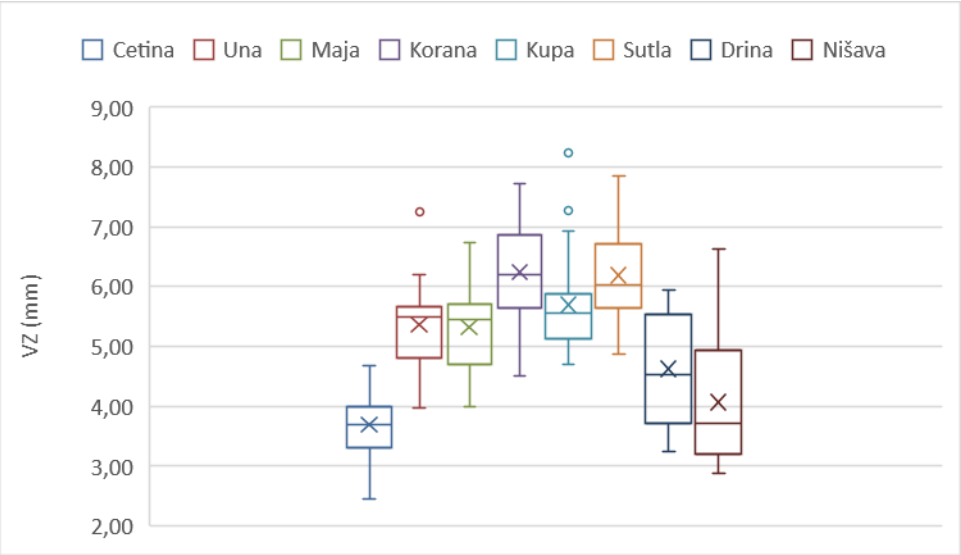
Slika 6. Morfometrijske vrijednosti širine kućice (ŠK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



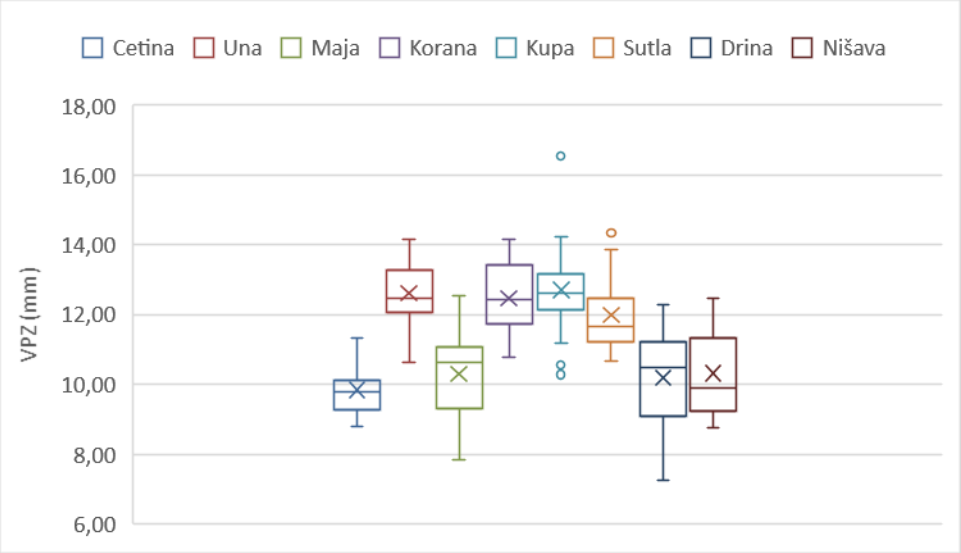
Slika 7. Morfometrijske vrijednosti visine ušća (VU) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



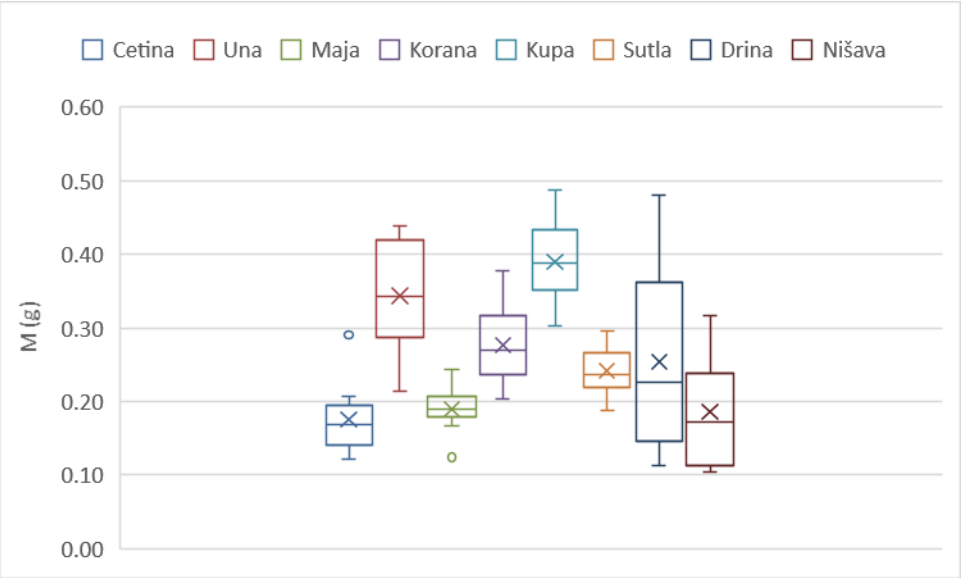
Slika 8. Morfometrijske vrijednosti širine ušća (ŠU) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



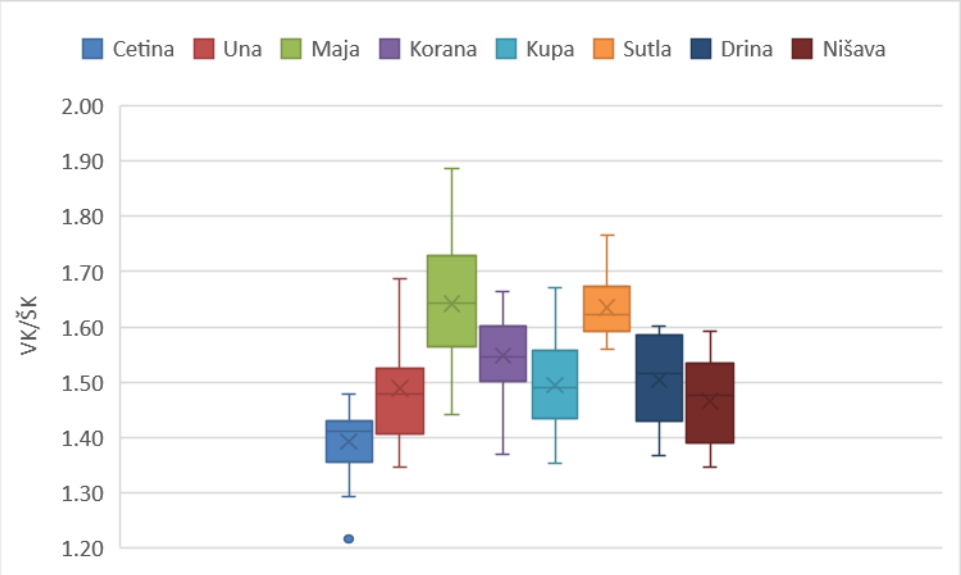
Slika 9. Morfometrijske vrijednosti visine zavojnice (VZ) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



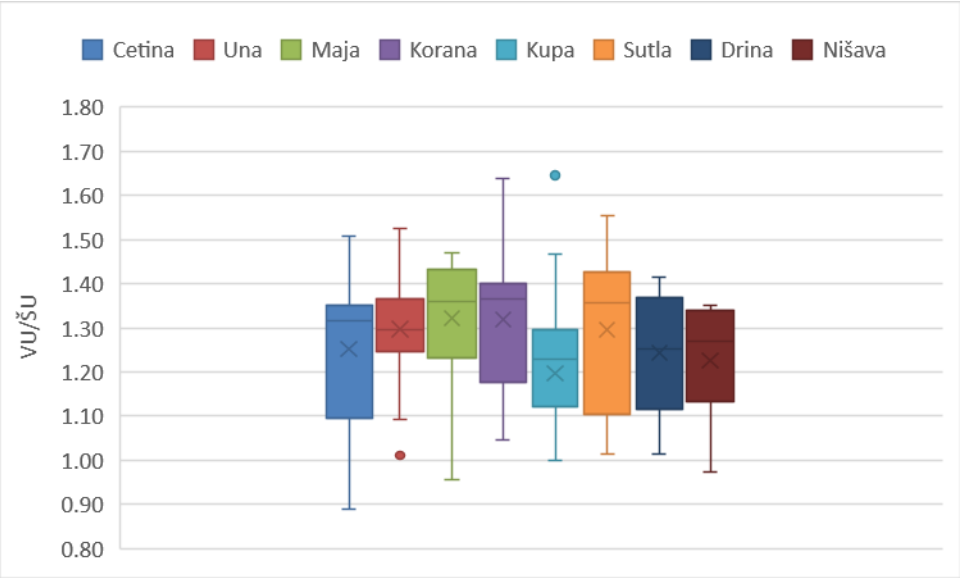
Slika 10. Morfometrijske vrijednosti visine posljednjeg zavoja (VPZ) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



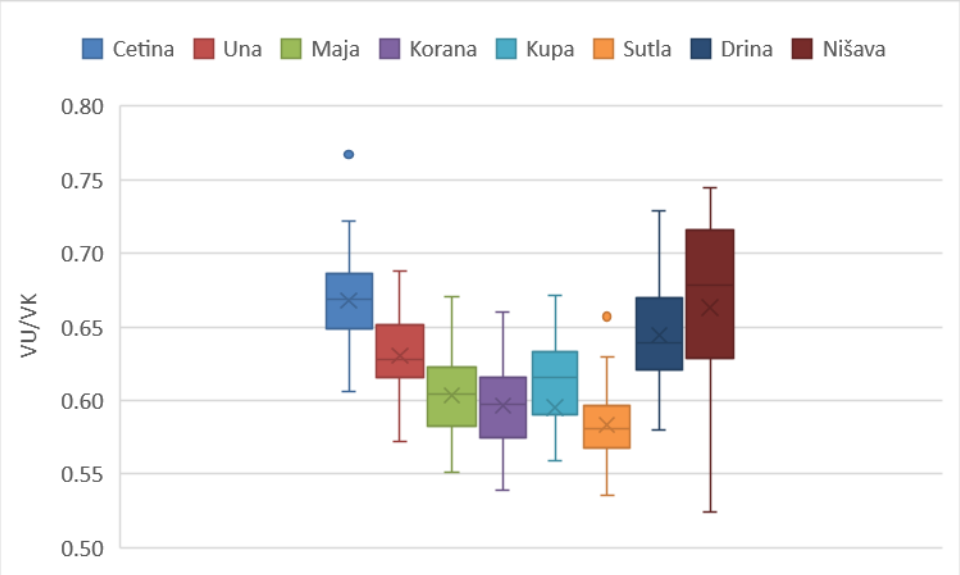
Slika 11. Vrijednosti mase kućice (M) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



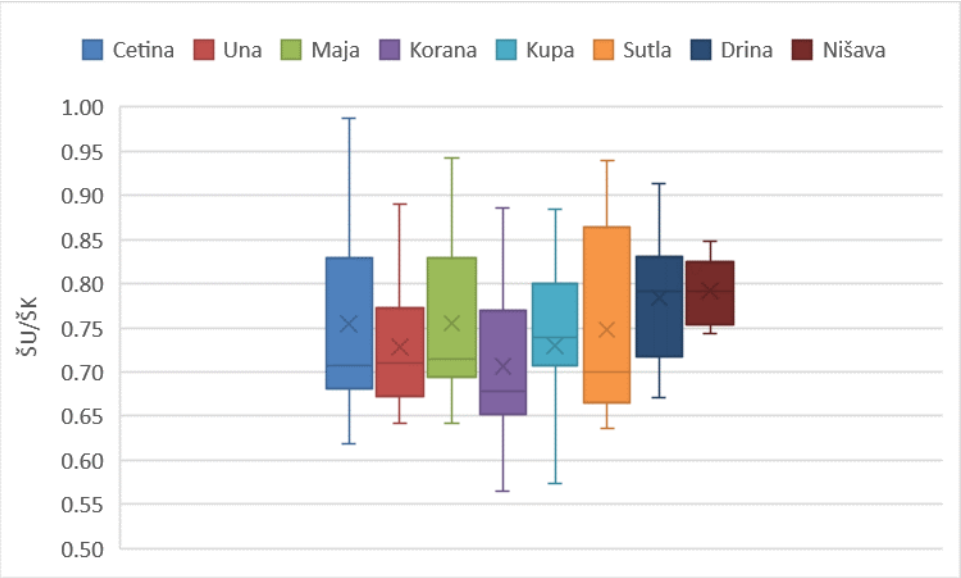
Slika 12. Vrijednosti omjera visine kućice i širine kućice (VK/ŠK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



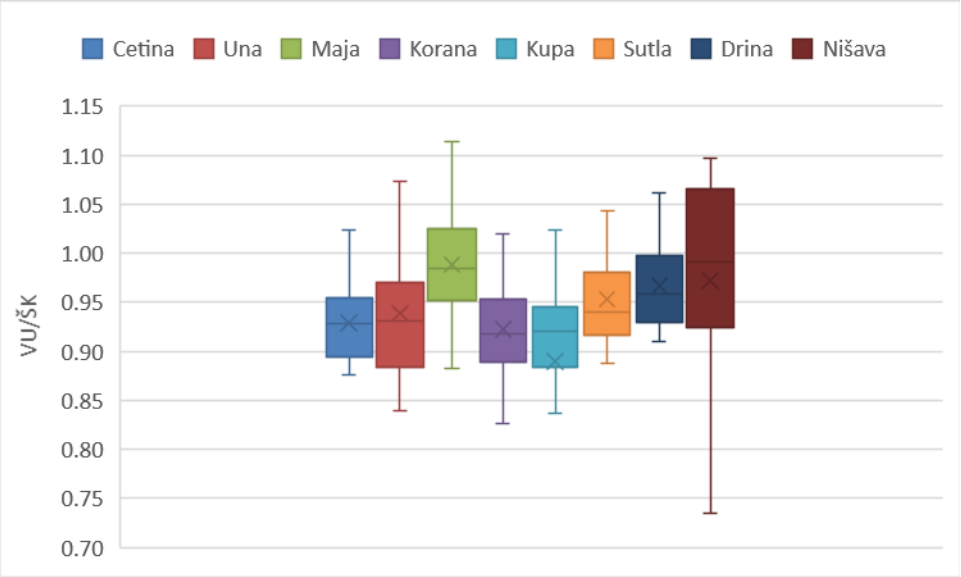
Slika 13. Vrijednosti omjera visine ušća i širine ušća (VU/ŠU) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



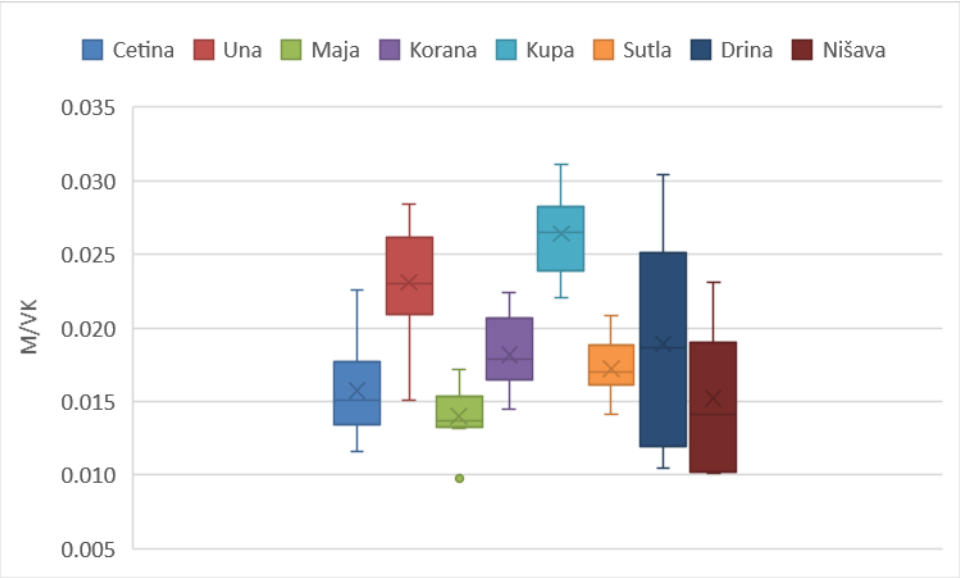
Slika 14. Vrijednosti omjera visine ušća i visine kućice (VU/VK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



Slika 15. Vrijednosti omjera širine ušća i širine kućice (ŠU/ŠK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



Slika 16. Vrijednosti omjera visine ušća i širine kućice (VU/ŠK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)



Slika 17. Vrijednosti omjera mase jedinki i visine kućice (M/VK) vrste *H. holandrii* na osam istraživanih lokaliteta (za objašnjenje pogledati Sliku 5)

Analiza morfometrijskih omjera Kruskal-Wallis testom (Tablica 6) ukazuje na postojanje morfometrijskih razlika koje su statistički značajne na razini p = 0,001, osim za omjer ŠU/ŠK koji je statistički značajno različit između postaja na razini p = 0,01 te omjer VU/ŠU sa slabijom statističkom značajnošću na razini p = 0,05.

Tablica 6. Kruskal-Wallis test morfometrijskih omjera vrste *H. holandrii* (za objašnjenje kratica pogledati Tablicu 3)

Kruskal-Wallis ANOVA (df = 7; N = 200)											
VK/ŠK		VU/ŠU		VU/VK		ŠU/ŠK		VU/ŠK		M/VK	
H	*p*	H	*p*	H	*p*	H	*p*	H	*p*	H	*p*
105,61	0,000	17,63	0,014	89,73	0,000	18,80	0,009	40,63	0,000	40,11	0,000

Analiza povezanosti morfometrijskih omjera ukazuje da je većina omjera statistički značajno međusobno srednje povezana (Tablica 7) te su ti omjeri međusobno proporcionalni kod VU/ŠK sa VK/ŠK, VU/ŠU, VU/VK te ŠU/ŠK sa VK/ŠK kao i VU/VK sa VU/ŠU. Omjer VU/VK također je srednje povezan s omjerom VK/ŠK, ali je ta povezanost obrnuto proporcionalna. Izdvaja se velika povezanost omjera ŠU/ŠK sa omjerom VU/ŠU uz obrnutu proporcionalnost povezanosti. Omjer M/VK statistički je značajno, ali slabo negativno povezan s omjerima ŠU/ŠK i VU/ŠK.

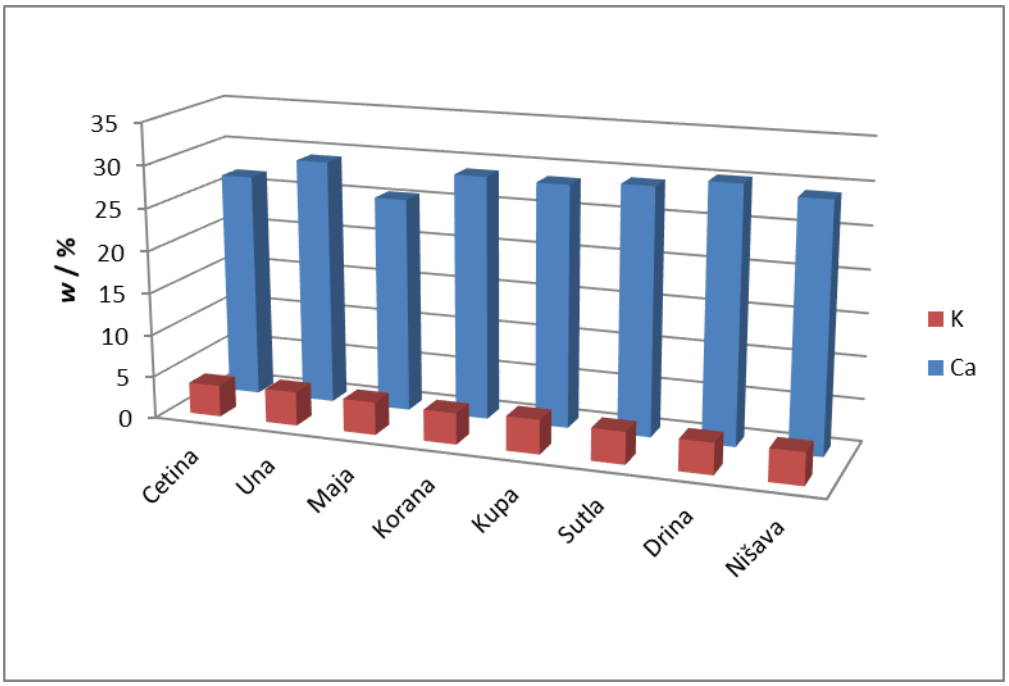
Tablica 7. Povezanost morfometrijskih omjera vrste *H. holandrii* izražena Pearsonovim koeficijentom korelacije (za objašnjenje kratica pogledati Tablicu 3)

Omjer	Korelacija *(r)*						
	p < 0,05*						
	M	SD	VK/ŠK	VU/ŠU	VU/VK	ŠU/ŠK	VU/ŠK
VK/ŠK	1,533	0,123	1,000	0,084	-0,542*	0,315*	0,499*
VU/ŠU	1,158	0,125	0,084	1,000	0,464*	-0,709*	0,582*
VU/VK	0,624	0,050	-0,542*	0,464*	1,000	-0,162	0,455*
ŠU/ŠK	0,828	0,071	0,315*	-0,709*	-0,162	1,000	0,149
VU/ŠK	0,953	0,073	0,499*	0,582*	0,455*	0,149	1,000
M/VK	0,019	0,005	-0,119	0,043	-0,160	-0,277*	-0,273*

M-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija

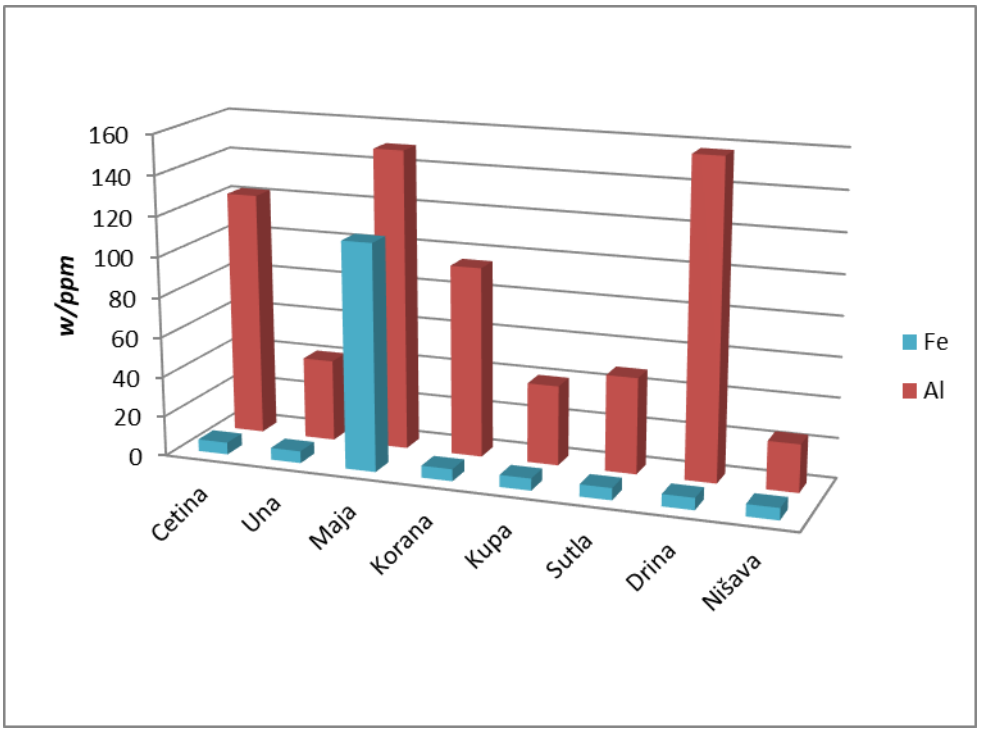
3.2. Rezultati kemijske analize

Rezultati kemijske analize prikazani su na slikama od 18 do 24. Rezultati na slikama su podijeljeni na tri podjedinice; sadržaj glavnih elemenata (Slika 18), elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu (Slike 19a, 20 i 21) i elemenata u tragovima (Slika 19b) u uzorcima kućica puževa.

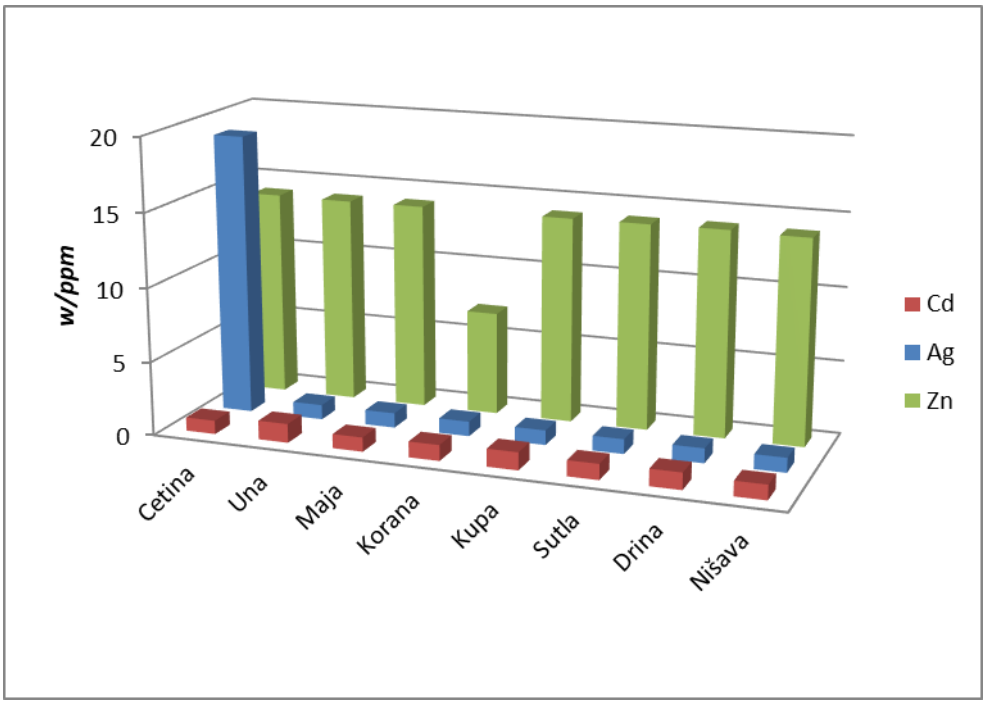


Slika 18. Postotni sastav glavnih elemenata u uzorcima kućice vrste *H. holandrii* prikupljenih na osam različitih lokaliteta, uz razrjeđenje 400 puta

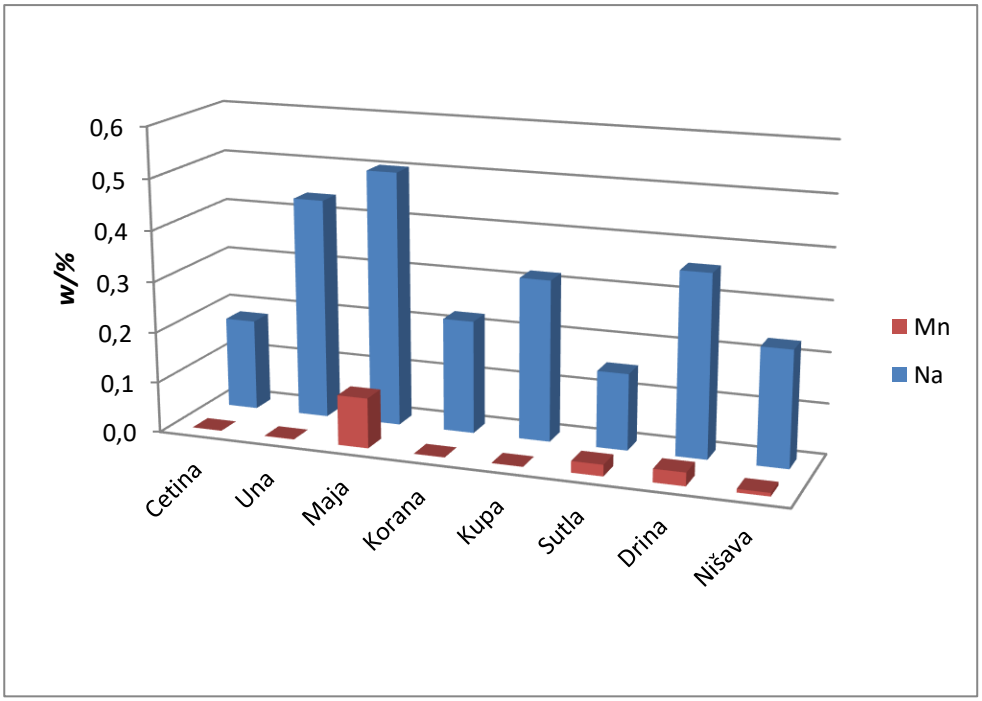
a)



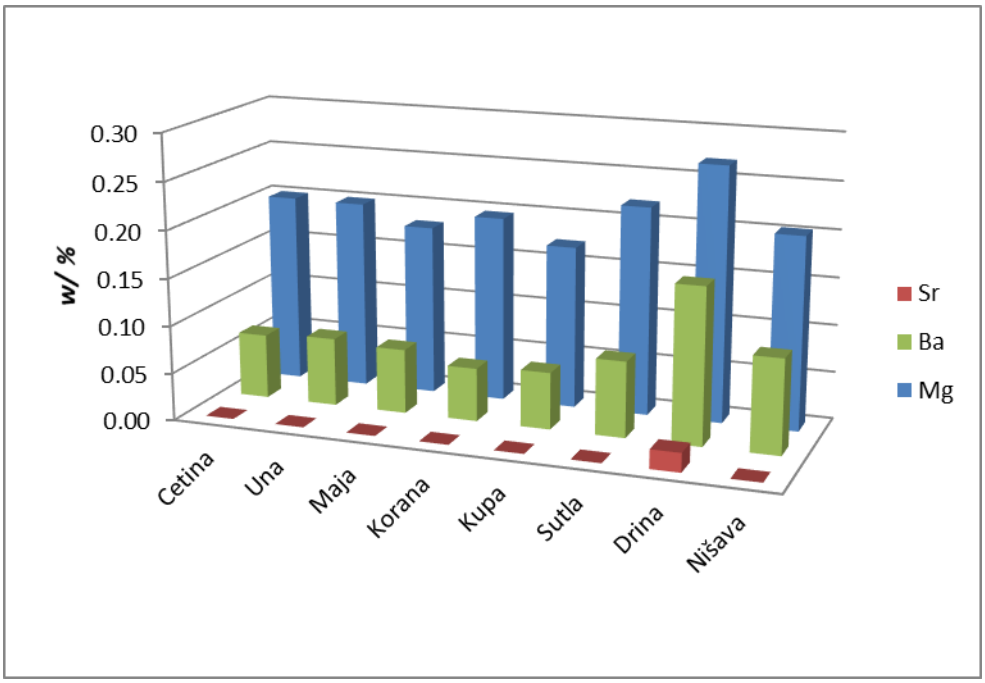
b)



Slika 19. Koncentracije elemenata u uzorcima kućice vrste *H. holandrii* prikupljenih na osam različitih lokaliteta, uz razrjeđenje 10 puta. a) Elementi u srednjem koncentracijskom rasponu, b) Elementi u tragovima



Slika 20. Postotni sastav elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu u uzorcima kućice vrste *H. holandrii* prikupljenih na osam različitih lokaliteta, uz razrjeđenje 10 puta



Slika 21. Postotni sastav alkalijskih i zemnoalkalijskih elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu u uzorcima kućice vrste *H. holandrii* prikupljenih na osam različitih lokaliteta, uz razrjeđenje 400 puta

Analizom provedenom metodom ICP-AES u Laboratoriju za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a analizirano je ukupno osam populacija, šest iz Hrvatske i dvije iz Srbije. Na jedinkama skupljenim ručno u razdoblju od 2008. do 2016. godine dobiveni su sljedeći rezultati.

U otopinama uzoraka najviše su zastupljeni elementi Ca i K. Postotni sastavi glavnih elemenata su: od 25,39 % na Maji do 30,13 % na Drini za Ca odnosno od 3,69 % na Korani do 4,05 % na Kupi za K. Neovisno o lokalitetu, njihove koncentracije su jednolično zastupljene, u graničnim razlikama od 5 %. Od elemenata u srednjem koncentracijskom rasponu u otopinama uzoraka identificirani su sljedeći elementi: Al, Ba, Fe, Mg, Mn, Na i Sr. Pritom su koncentracijski rasponi za Al od 23,92 μg g^{-1} na Nišavi do 157,49 μg g^{-1} na Drini. Sadržaj željeza u većini uzoraka mjeren je na razini detekcijske granice, osim u kućicama iz Maje u kojima je utvrđena koncentracija od 112,95 μg g^{-1}.

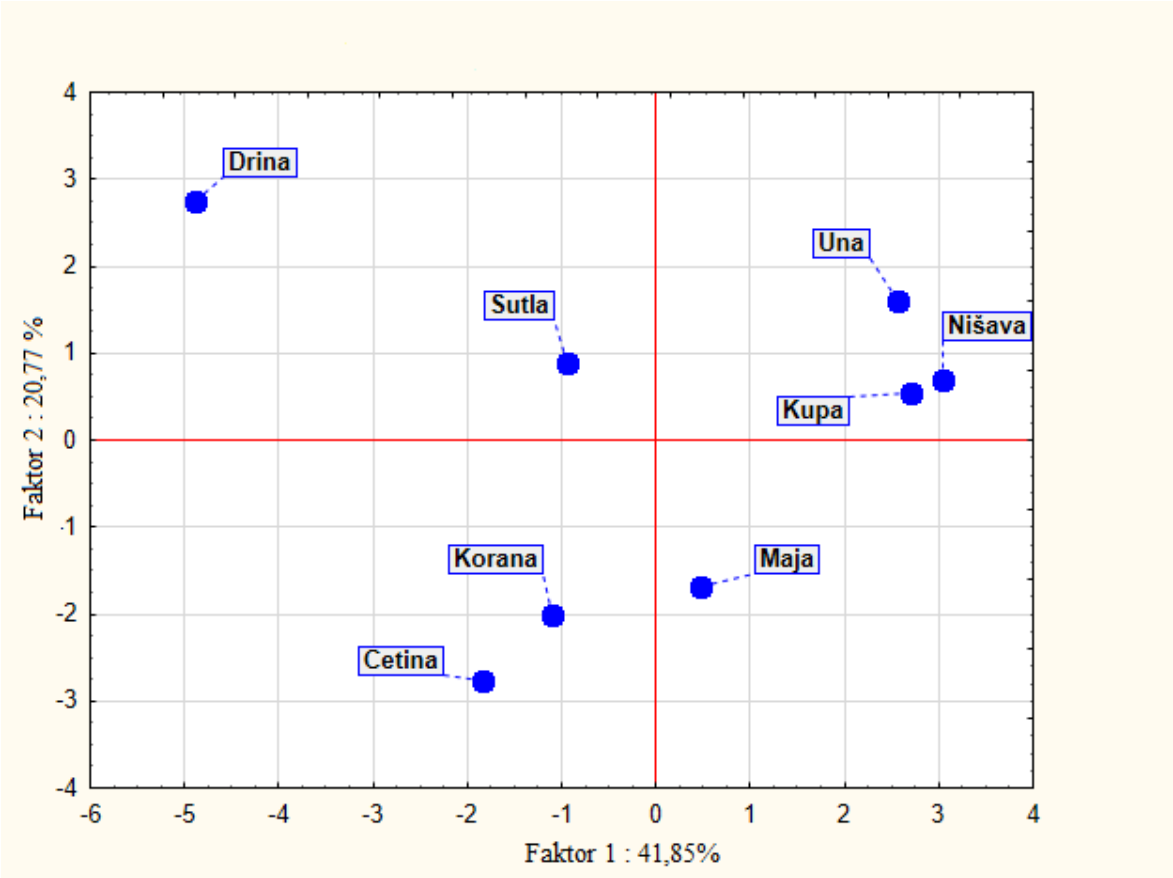
Ba, Mg, Mn, Na i Sr zastupljeni su u većim koncentracijama stoga su njihovi udjeli izraženi u postotnom sastavu. Zastupljenost navedenih elemenata je od 0,001 % na Uni do 0,099 % na Maji za Mn odnosno 0,15 % na Sutli do 0,50 % na Maji za Na. Postotni sastav za Ba kreće se od 0,06 % na Korani do 0,2 % na Drini, za Mg od 0,17 % na Kupi do 0,27 % na Drini. Povećani udio Sr izmjeren je samo jedinkama uzorkovanim u Drini te iznosi 0,02 %.

Mjerene koncentracije elemenata u tragovima kreću se u graničnim vrijednostima. Vrijednosti za Cd nalaze se u koncentracijskom rasponu od 0,92 μg g^{-1} na Cetini do 1,28 μg g^{-1} na Uni. Dobivene vrijednosti za Zn na svim lokalitetima nalaze se ispod detekcijskih granica. Učinkovitost analitičkih postupaka koji uključuju otapanje uzoraka u dušičnoj kiselini i mikrovalnu razgradnju uzoraka ispitana je upotrebom referentnih uzoraka sedimenata SRM 1d (engl. *argillaceous limestone*), uzorak glinenog škriljevca i SRM 88b (engl. *dolomitic limestone*), uzorak dolomitske stijene koji su sličnog kemijskog sastava kao i ispitivani uzorci. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Elementni sastav certificiranih referentnih materijala NIST SRM 1d (*agrillaceous limestone*) i NIST SRM 88b (*dolomitic limestone*)

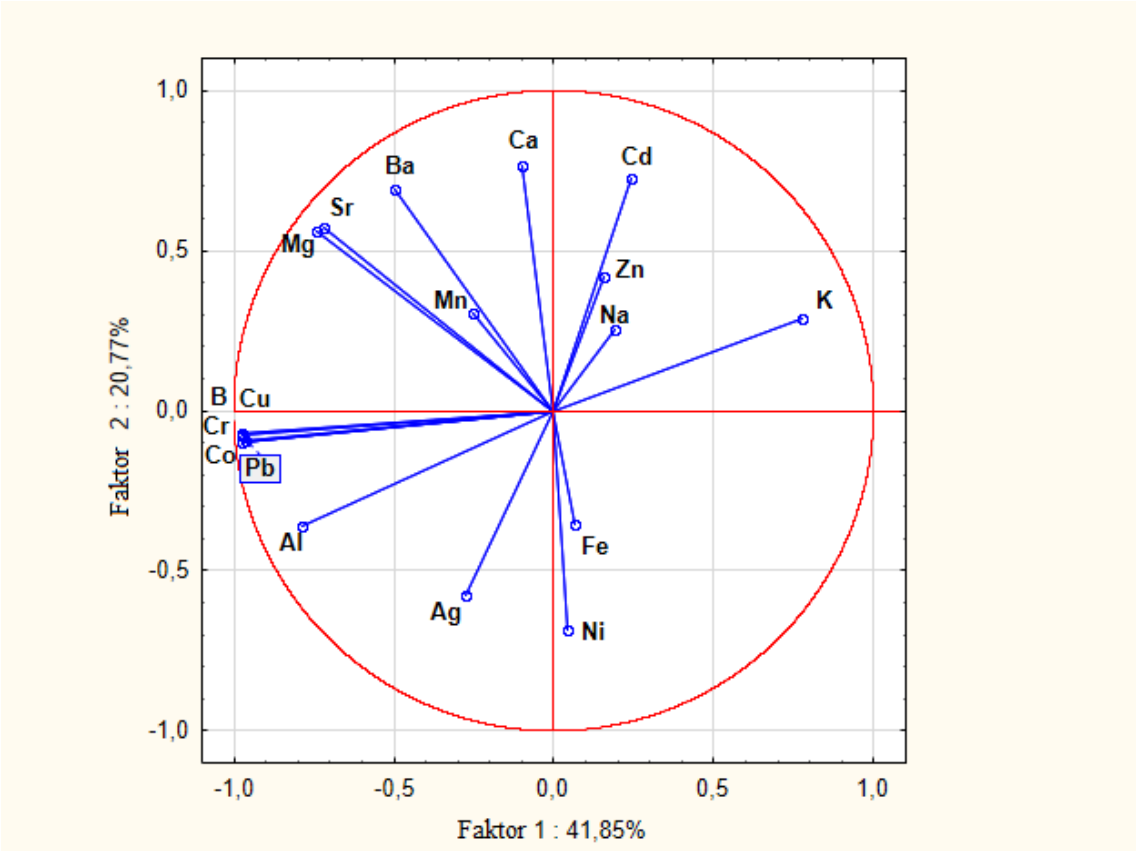
	SRM 1d			SRM 88b		
Element	Certificirana vrijednost (μg/g)	Mjerena vrijednost (μg/g)	Analitički povrat (%)	Certificirana vrijednost (μg/g)	Mjerena vrijednost (μg/g)	Analitički povrat (%)
Al	2784 ± 69	2079, 835	74,70	1778 ± 69	660,841	37,17
Ca	377714	350644	92,83	214049 ± 357	172839	80,74
Co	-	2,998	-	1,02	2, 998	-
Cr	8,21 ± 1,37	2,999	36,53	2,33	2,999	128,71
Fe	2231,9 ± 47,6	2081,834	93,28	1937 ± 14	779,813	40,26
K	1127 ± 38	43935	-	855,1 ± 19,9	56187	-
Mg	1815,2 ± 60,3	4997	-	126819 ± 422	135567	106,89
Mn	209 ± 5	168,905	99,81	123,9 ± 9,3	9,998	8,07
Na	80,9 ± 11,9	273,847	-	215,14 ± 5,19	182,956	85,04
Ni	4	2,998	74,95	-	2,998	-
Sr	256,2 ± 8,5	0	0	-	360	-
Zn	17,7 ± 2,4	13,997	79,08	-	13,997	-

Analizom glavnih komponenata (PCA) utvrđeno je da je prvom glavnom komponentom (PC1) objašnjeno 41,85 % ukupne varijance, a s drugom (PC2) 20,77 %. Ukupno, gledajući prve dvije glavne komponente (PC1/PC2) protumačeno je 62,62 % varijance. Dobivene vrijednosti prikazane su na Slici 22.



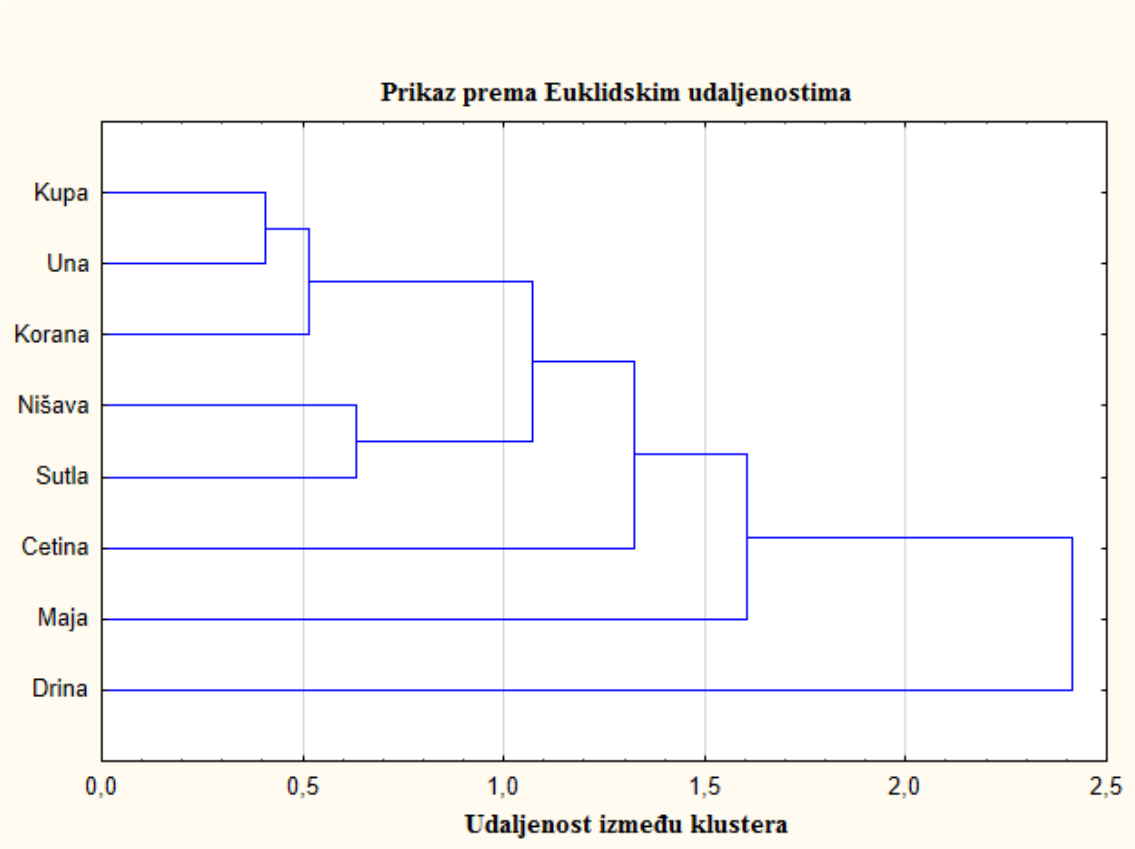
Slika 22. Dijagram pogodaka za prve dvije glavne komponente (PC1/PC2) dobiven metodom analize glavnih komponenata

Nadalje, vrijednosti glavnih komponenata koristile su se za daljnje analize pri čemu je u konačnici cijeli skup podataka podijeljen u dvije skupine. Na Slici 23 prikazana su faktorska opterećenja svakog pojedinog elementa. Pritom je došlo do grupiranja uzoraka u tri skupine. Duž pozitivne osi PC2 grupirali su se elementi: Mg, Sr, Mn, Ba, Ca, Cd, Zn, Na i K. Ovo grupiranje odgovara skupini uzoraka prikupljenih na Drini, Sutli, Uni, Kupi i Nišavi. Duž negativne osi PC2 grupiraju se elementi: Cr, Co, Pb, Al, Ag, Fe i Ni. Navedeni elementi odgovaraju skupini uzoraka prikupljenih na Korani, Cetini i Maji.



Slika 23. Faktorska opterećenja varijabli u sustavu PC1/PC2

Rezultati istraživanja temeljeni na kemijskom sastavu kućica (Slika 24) pokazali su da populacije puževa iz Kupe i Une imaju najsličniji sastav, a njima se pridružuje i populacija iz Korane. Puževi iz Nišave i Sutle grupirali su se zajedno, a po kemijskom sastavu najsličniji su grupi koju čine puževi iz Une, Kupe i Korane. Kućice puževa iz Cetine razlikuju se od ostalih no još veća razlika u sastavu utvrđena je kod puževa iz Maje. Najmanju sličnost s ostalim populacijama imaju puževi uzorkovani u Drini.



Slika 24. Dendogram rezultata dobivenih hijerarhijskom analizom klastera prema Euklidskoj udaljenosti metodom pojedinačne vezanosti (engl. *Single Linkage*)

4. RASPRAVA

S obzirom da je vrsta *H. holandrii* široko rasprostranjena u rijekama, potocima i jezerima gdje preferira čvrsti supstrat (kamenje, stijene, drvo) (Glöer, 2002) te da pripada strugačima (Moog, 2002), za pretpostaviti je da je elementni sastav odraz prehrane i biomineralizacijskih procesa kojima je podložna tijekom života.

Kako bi se istražio kemijski sastav kućica puževa te utvrdila potencijalna povezanost sa morfometrijskim značajkama kućice, ali i ranije provedenim molekularno-filogenetičkim i filogeografskim analizama (Lovrenčić, 2015), u okviru ovog diplomskog rada provedeno je istraživanje na šest populacija iz Hrvatske (rijeke Cetina, Una, Maja, Korana, Kupa, Sutla) te dvije populacije iz Srbije (rijeke Drina i Nišava).

Usporedivši uzorke, puževi uzorkovani u Maji svojim su se vanjskim izgledom najviše razlikovali od ostalih jer su kućice bile potpuno glatke, bez izraženih grebena. Iz provedene analize morfometrijskih značajki kućica vidljivo je da se puževi uzorkovani na Cetini i Korani izdvajaju svojim morfološkim vrijednostima. Pritom, najnižu srednju vrijednost svih parametara imale su jedinke iz Cetine dok su jedinkama iz Korane izmjerene najviše srednje vrijednosti VK, VU i VZ.

Kako bi se isključile individualne razlike u veličini jedinki provedena je analiza šest morfometrijskih omjera. Najveću srednju vrijednost omjera VK/ŠK imali su puževi uzorkovani u Maji što znači da imaju usku kućicu, za razliku od puževa iz Cetine koji su imali najmanju srednju vrijednost omjera VK/ŠK, odnosno karakterizira ih široka kućica. Srednje vrijednosti omjera VU/ŠU pokazale su da puževi iz Maje imaju i najuže ušće dok najšire ušće imaju puževi iz Kupe. Analizirajući srednje vrijednosti omjera VU/VK može se zaključiti da puževi iz Sutle imaju najkraće ušće, odnosno imaju najvišu zavojnicu za razliku od puževa iz Cetine koje karakterizira najkraća zavojnica. Jedinke iz Korane imaju najmanju srednju vrijednost omjera ŠU/ŠK dok je najveća srednja vrijednost ovog omjera utvrđene jedinkama iz Nišave što znači da puževi iz Korane u odnosu na širinu kućice imaju uže ušće za razliku od puževa iz Nišave kojima je ušće šire. Jedinke iz Maje imaju najveću srednju vrijednost omjera VU/ŠK, dok najmanju vrijednost ovog omjera imaju jedinke iz Kupe što znači da puževi iz Maje imaju više ušće u odnosu na širinu kućice za razliku od puževa iz Kupe čije ušće je niže. Najveću srednju vrijednost omjera M/VK imale su jedinke s lokaliteta

Kupa, a najmanju one uzorkovane u Maji iz čega se može zaključiti da puževi iz Kupe imaju najteže kućice dok su kućice puževa iz Maje najlakše.

Rezultati Kruskal-Wallis testa provedenog na morfometrijskim omjerima pokazali su da su morfometrijske razlike između postaja statistički značajne na razini $p = 0{,}001$, osim za omjer ŠU/ŠK ($p = 0{,}01$) te omjer VU/ŠU ($p = 0{,}05$). Analiza povezanosti morfometrijskih omjera (Pearsonov koeficijent korelacije) ukazuje da je većina omjera statistički značajno međusobno srednje povezana te su ti omjeri međusobno proporcionalni. Posebno treba istaknuti omjer VU/ŠK koji je statistički značajno pozitivno povezan sa još tri omjera: VK/ŠK, VU/ŠU i VU/VK.

Metodom ICP-AES analiziran je kemijski sastav kućica puževa. Rezultati analize su pokazali da se, u usporedbi s ostalim populacijama, kućice puževa iz Maje i Drine najviše razlikuju. U uzorcima prikupljenim iz Maje utvrđena je povećana koncentracija elemenata Fe, Al, Na i Mn, dok je u uzorcima iz Drine utvrđen najveći udio sljedećih elemenata: Al, Mg, Ba i Sr te povećana koncentracija Na.

Kemijski element aluminij je litofilni element, treći po zastupljenosti u Zemljinoj kori, a u slatkim vodama zastupljen je u koncentracijama od oko 0,24 mg L^{-1}. U okoliš se vraća u obliku raznovrsnog industrijskog otpada i samim time je njegov utjecaj na živi svijet nepoznanica (Halamić i Miko, 2009). Na području Republike Hrvatske najveće koncentracije aluminija zabilježene su u Primorskoj i Središnjoj Hrvatskoj što odgovara rezultatima naših mjerenja u kojima su najveće koncentracije ovog elementa izmjerene na području Maje i Cetine. Prema Halamić i Miko (2009) veće vrijednosti ovog elementa izmjerene su na području Cetine (od 7,89 do 8,98 %), s porastom njegove zastupljenosti prema južnijim dijelovima dok se na području Maje te vrijednosti kreću do 5 %. Najviše vrijednosti ovog elementa u našem istraživanju utvrđene su u uzorcima puževa iz Drine.

Barij je slabo rasprostranjen litofilni element u Zemljinoj kori, no u potočnim sedimentima veže se na lističnu detritus. Samim time njegova zastupljenost u slatkovodnim područjima varira. U Republici Hrvatskoj izmjerene su povećane koncentracije barija na području Gline koje nastaju kao posljedica trošenja barita iz baritnih pojava na Petrovoj gori, a osim toga mogu se javiti i kao posljedica antropogenih utjecaja (Halamić i Miko, 2009). Zastupljenost ovog elementa u našim uzorcima uzorkovanim na području Republike Hrvatske je mala, ujednačena na svim dijelovima, za razliku od onih prikupljenih na lokalitetima Drina i Nišava. S obzirom da se ovaj element veže za kalij te kasnije od njega

razdvaja trošenjem i u hidrotermalnim otopinama, moguće da su povećane koncentracije na području Srbije posljedica zastupljenosti ovih uzoraka na području s povećanom koncentracijom kalija.

Kalcij je glavni gradivni element, kako Zemljine kore tako i kućica puža. Njegova koncentracija u tlu znatno se razlikuje. Najviše se koncentrira u karbonatima i sedimentnim karbonatnim stijenama. U kiselim uvjetima dolazi do otapanja karbonata te taloženja Ca^{2+} iona u organsku materiju odnosno izgradnju bioloških struktura. Slatkovodne vrste kalcij dobivaju iz okolne vode te hrane (White i sur., 2007). Kao što je već ranije navedeno, vrsta *H. holandrii* pripada slatkovodnim puževima koji žive u rijekama i jezerima gdje preferira podloge kao što su šljunak, kamenje, stijene i drva s kojih struže obraštaj koji joj služi kao hrana (Glöer, 2002; Moog, 2002). S obzirom da je područje Republike Hrvatske prekriveno kršom, *H. holandrii* struganjem takve podloge zajedno s hranom i vodom u tijelo unosi kalcij koji ugrađuje u kućice. Iz rezultata dobivenih našim istraživanjem kalcij je jednoliko zastupljen u svim uzorcima uzorkovanim na osam različitih lokaliteta. No, iz dosadašnjih, poznatih podataka, na Sutli, Cetini i Maji, s kojih su uzorkovane kućice korištene u ovom istraživanju zabilježene su vrlo velike vrijednosti ovog elementa (>14,13 %) (Halamić i Miko, 2009) što je u suprotnosti s našim rezultatima, odnosno bilo je za pretpostaviti da će na tim lokalitetima koncentracija kalcija u kućicama biti viša.

Isto tako, kalij se obogaćuje u kiselim magmatskim stijenama stoga je glavna komponenta u raznim stijenskim mineralima. Njegove koncentracije u tlu povećavaju se trošenjem stijena. Koncentracije kalija u tlu puno su manje nego u biljkama te se taj nedostatak nadoknađuje umjetnim gnojivima. Iako se otprije poznate izmjerene koncentracije kalija na području Središnje Hrvatske razlikuju od onih u Primorskoj Hrvatskoj, koncentracije kalija dobivene našim istraživanjem variraju oko ujednačenih vrijednosti odnosno koncentracije kalija u uzorcima s Cetine se ne razlikuju znatno od onih uzorkovanih na Uni, Maji, Korani, Kupi i Sutli. Dobiveni rezultati ne odgovaraju otprije poznatim u kojima su u sastavu geološke podloge na području Cetine izmjerene manje koncentracije ovog elementa (<0,18 %) (Halamić i Miko, 2009).

Natrij ima bliski kristalokemijski odnos s kalcijem, što im omogućuje međusobnu zamjenu. Zbog kemijskog trošenja, njegove koncentracije u sedimentu su male, ali s druge strane zbog ekstremne topljivosti njegov transport je vrlo jednostavan. Nastale varijacije u njegovom udjelu na pojedinom lokalitetu mogu se javiti kao posljedica navedenoga. Najveće

koncentracije ovog elementa izmjerene su u Središnjoj Hrvatskoj, na području Moslavačke gore i Bilogore. S druge strane, najmanje koncentracije natrija na području Središnje Hrvatske izmjerene su u dijelovima uz rijeku Savu te na području južno od Karlovca, dok su najniže vrijednosti natrija u Hrvatskoj zabilježene na području Dalmacije (Halamić i Miko, 2009). Za razliku od očekivanog, u našim su istraživanjima u kućicama puževa uzorkovanim na području Banovine, u rijekama Uni i Maji, izmjerene povišene koncentracije natrija te će biti potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo da li je to rezultat antropogenog utjecaja.

Povećane koncentracije kadmija na području Republike Hrvatske svojstvene su područjima s rudarskom aktivnošću. Koncentracije kadmija izmjerene metodom ICP-AES na svim istraživanim lokalitetima su blizu detekcijskih granica od 1 μg g^{-1} što odgovara dosad poznatim rezultatima istraživanja u kojima su na području Središnje Hrvatske izmjerene male koncentracije kadmija u tlu. Iznimka je područje oko Cetine gdje je analizom geološke podloge utvrđeno da se vrijednosti ovog elementa kreću od 1,8 mg kg^{-1} na više (Halamić i Miko, 2009).

Željezo je glavni litofilni element. U slatkoj vodi ga ima 0,1 mg L^{-1}. Prema Jatto i sur. (2010) željezo je jedan od najzastupljenijih metala na zemlji. Moguće je da kućica puža otpušta željezo u obliku Fe^{3+} iona pri čemu nastaje $Fe(OH)_3$ koji je koristan u vodoobskrbi i tretmanu otpadnih voda (Ademoroti, 1983; Jatto i sur., 2010). Izmjerene koncentracijske vrijednosti ukazuju na povećan udio na području Maje, no još uvijek ispod graničnih vrijednosti, izmjerenih u sastavu geološke podloge (2,10 %) (Halamić i Miko, 2009).

Magnezij ima bliski kristalokemijski odnos s Fe^{2+}. Njegova vrijednost u tlima varira s obzirom na poljoprivredne djelatnosti na pojedinim područjima odnosno u tlima se obnavlja primjenom raznih umjetnih gnojiva. U ovom su radu najveće koncentracije magnezija izmjerene u kućicama puževa uzorkovanih u Drini, dok su na području Republike Hrvatske izmjerene u Sutli (>0,96 %). Povećane koncentracije ovog elementa u regiji Središnje Hrvatske na područjima oko Hrvatskog zagorja nastaju kao posljedica geološke podloge odnosno trošenja magmatskih i dolomitskih stijena (Halamić i Miko, 2009).

Mangan je kao prijelazni element blizak skupini željeza stoga je njihov međusobni odnos u magmatskim stijenama; Fe/Mn od 35 do 90, što je vidljivo u provedenom eksperimentu u kojem su oba elementa prisutna samo na području Maje. Na ostalim uzorcima koncentracije mangana izmjerene su unutar detekcijskih granica. Otprije poznata mjerenja geološke

podloge ističu vrlo malene koncentracije mangana u skoro svim regijama Republike Hrvatske, a iznimka je Primorska Hrvatska gdje su izmjerene veće koncentracije na području srednje Dalmacije (Halamić i Miko, 2009). U ovom istraživanju, na području Primorske Hrvatske mjerene su koncentracije mangana iz Cetine no bez obzira na otprije poznate činjenice konačni rezultati ne izdvajaju ovaj lokalitet od ostalih.

Kemijski element stroncij nalazi se u tragovima, upravo zbog toga što se nalazi u frakciji s kalcijem i kalijem tvoreći sitnozrnati sediment. Povećane koncentracije ovog elementa izmjerene su u sjevernim dijelovima Središnje Hrvatske. Pritom se u navedenoj regiji ističe područje Banovine i Medvednice (Halamić i Miko, 2009). Metodom ICP-AES izmjerene koncentracije ovog elementa u kućicama puževa nalaze se unutar detekcijskih granica na svim područjima uz manje odstupanje u rijeci Drini.

Cink se u okoliš raspršuje kroz pigmente boje, pocinčano željezo, baterije, otpadne vode te na razne druge načine (Halamić i Miko, 2009). Metodom ICP-AES izmjerene koncentracijske vrijednosti za prijelazni kemijski element u tragovima, cink, na svim mjerenim područjima variraju oko ujednačenih vrijednosti. Manja odstupanja u provedenom istraživanju pokazuju rezultati mjerenja ovog elementa u uzorcima prikupljenim iz Korane. Dobiveno istraživanje odgovara otprije poznatim mjerenjima geološke podloge koja u regiji Središnje Hrvatske bilježe veće koncentracije cinka na odvojenim područjima Ribnika do izvorišnog toka rijeke Korane istočno od Slunja dok je na područjima Korane ovaj element zastupljen u manjim koncentracijama. S druge strane, rezultati provedenog istraživanja u kojima su metodom ICP-AES izmjerene veće koncentracije cinka na području Cetine ne podudaraju se s ranijim mjerenjima geološke podloge. U regiji Primorske Hrvatske, na području Cetine mjerene koncentracijske vrijednosti za ovaj element kreću se od 116 mg kg^{-1} na više (Halamić i Miko, 2009).

Molekularno-filogenetičku i filogeografsku analizu vrste *H. holandrii* u Hrvatskoj provela je Lovrenčić (2015). Analizirajući 11 populacija autorica je utvrdila da se vrsta dijeli na tri haplogrupe. U prvu grupu pripadaju populacije iz rijeke Korane, Kupe, Kupčine, Mrežnice i Une, drugu grupu čine populacije iz Maje, Petrinjčice, Sutle, Save i Bregane, a treću grupu čine haplotipovi iz rijeke Cetine. Rezultati naših istraživanja temeljeni na kemijskom sastavu kućica pokazali su da su upravo populacije puževa iz Kupe, Une i Korane međusobno najsličnije što se u potpunosti podudara s istraživanjima Lovrenčić (2015). S druge strane, gledajući kemijski sastav kućica, populacije iz Maje se najviše razlikuju od

ostalih populacija uzorkovanih na području Hrvatske. Kao što je već ranije istaknuto, upravo populacije puževa iz Maje karakteriziraju kućice koje su glatke (bez izraženih grebena), uske i lagane.

Mierzwa (2011) u svojim istraživanjima ističe utjecaj supstrata i biljne hrane koju puževi koriste na sastav kućice. Poznato je kako se kalcij, kao najizraženija komponenta kućice, u strukturi zbog sličnih kemijskih svojstava, izmjenjuje sa stroncijem i barijem odnosno prelazi u stabilniji oblik aragonit. S obzirom da je u ovom istraživanju u uzorcima zastupljena veća koncentracija kalcija nego barija i stroncija možemo pretpostaviti da u sastavu kućice vrste *H. holandrii* prevladava kalcit kao glavna komponenta.

Ostali elementi također pridonose strukturi i rastu kućice. Više koncentracije aluminija, kao što je to slučaj kod populacija uzorkovanih na Maji i Drini sadržan je u kućicama s karbonatnih područja, u usporedbi s onima s aluvijalnih tla (Mierzwa, 2011).

U nadolazećim istraživanjima trebalo bi rendgenskom analizom pobliže ispitati mineralni sastav kućice vrste *H. holandrii* te pomnije razmotriti biomineralizacijske procese koji se zbivaju prilikom izgradnje kućice.

5. ZAKLJUČAK

- Iz provedene analize morfometrijskih značajki kućica vidljivo je da se puževi uzorkovani na Cetini i Korani izdvajaju svojim morfološkim vrijednostima. Pritom, najnižu srednju vrijednost svih parametara imale su jedinke iz Cetine dok su jedinkama iz Korane izmjerene najviše srednje vrijednosti VK, VU i VZ.
- Na osnovu omjera morfometrijskih značajki može se zaključiti sljedeće: puževi uzorkovani u Maji imaju najužu kućicu, s najužim ušćem i s najmanjom masom; puževi iz Cetine imaju najširu kućicu, s najvišim ušćem odnosno najkraćom zavojnicom; puževi iz Kupe imaju najšire ušće i najveću masu kućice; puževi iz Sutle imaju najkraće ušće, odnosno najvišu zavojnicu.
- Rezultati Kruskal-Wallis testa provedenog na morfometrijskim omjerima pokazali su da su morfometrijske razlike između postaja statistički značajne na razini p = 0,001, osim za omjer ŠU/ŠK (p = 0,01) te omjer VU/ŠU (p = 0,05).
- Analiza povezanosti morfometrijskih omjera (Pearsonov koeficijent korelacije) ukazuje da je većina omjera statistički značajno međusobno srednje povezana te su ti omjeri međusobno proporcionalni. Posebno treba istaknuti omjer VU/ŠK koji je statistički značajno pozitivno povezan s još tri omjera: VK/ŠK, VU/ŠU i VU/VK.
- Metodom ICP-AES analiziran je kemijski sastav kućica puževa. Rezultati analize su pokazali izdvajanje uzoraka prikupljenih iz Maje i Drine. Pritom je na Maji utvrđena povećana koncentracija elemenata Fe, Al, Na i Mn. S druge strane, u uzorcima iz Drine utvrđen je najveći udio elemenata: Al, Mg, Ba i Sr te povećana koncentracija Na.
- Klaster analizom ustanovljena je najveća sličnost između populacija puževa prikupljenih na Kupi i Uni, a najveća različitost populacija puževa prikupljenih na Drini. Navedenom analizom ustanovljeno je grupiranje populacija uzoraka prikupljenih na Kupi, Uni, Korani s populacijom uzoraka s Nišave i Sutle. Odnosno, njihova grupacija s uzorcima prikupljenih na toku Cetine te nadalje s populacijom uzoraka prikupljenih na Maji.
- Varijacije u mjerenim koncentracijama metala u uzorcima kućica vrste *H. holandrii,* s osam različitih lokaliteta, vjerojatno su uzrokovane razlikama u kemijskom sastavu podloge na kojoj vrste žive, ali i hranom koju unose te antropogenim djelovanjem.

- U nadolazećim istraživanjima trebalo bi rendgenskom analizom pobliže ispitati mineralni sastav kućice vrste *H. holandrii* te pomnije razmotriti biomineralizacijske procese koji se zbivaju prilikom izgradnje kućice.

6. LITERATURA

Ademoroti, C. M. A. (1983): Optimization of Heavy Metal Removal from Municipal Sewage by Coagulation. AMAN, University of Benin, 3:145-152

Bornancin, L., Bonnard, I., Mills, S. C. Banaigs, B. (2017): Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions, Natural Product Reports, 34: 644: 1-33.

Bouchet, P. (2007): Inventorying the molluscan fauna of the world: how far to go? U: Jordaens, K., van Houtte, N., Van Goethem, J.,Backeljau, T. (ur) Abstracts of the World Congress of Malacology, Antwerp, Belgium

Cuif , J.-P., Dauphin, Y., Nehrke, G., Nouet, J. , Perez-Huerta, A. (2012): Layered Growth and Crystallization in Calcareous Biominerals: Impact of Structural and Chemical Evidence on Two Major Concepts in Invertebrate Biomineralization Studies. Minerals, 2: 11-39 (citirano prema Lowensten i Weiner, 1989)

Cuttelod, A., Seddon, M., Neubert, E. (2011): European Red list of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Čadež, V. (2015): Biomineralne strukture aragonita morskih beskralješnjaka: morfološke, strukturne i biokemijske značajke, Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb (citirano prema Cuif i sur., 2012)

Dobrović, A. (2015): Raznolikost i struktura zajednice puževa (Mollusca, Gastropoda) srednjeg i donjeg toka rijeke Cetine. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Fricke, M., Volkmer, D., (2007): Crystallization of Calcium Carbonate Beneath Insoluble Monolayers: Suitable Models of Mineral – Matrix Interactions in Biomineralization? Topics in *Current Chemistry*, 270: 1-41 (citirano prema Weiner i Addadi, 1997)

Glöer, P. (2002): Die Süßwassergastropoden Nord-und Mitteleuropas, Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands, 73 Teil

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Vidaković, J., Kučinić, M., Špoljar, M., Matoničkin, R., Miliša, M. (2004): Protista - Protozoa i Metazoa- Invertebrata.

Funkcionalna građa i praktikum, knjiga 3, prvo izdanje, Meridijani, Samobor (citirano prema Matoničkin i sur., 1998)

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

Halamić, J., Miko, S. (2009): Geokemijski atlas Republike Hrvatske, Hrvatski geološki institut, Zagreb (citirano prema Kabata-Pendias i Mukherjee, 2007)

Hill, S. J. (2007): Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, Blackwell Publishing Ltd., Oxford

Hopkins, W. G. (2000): A new view of statistics. Internet Society for Sport Science: preuzeto 15.11.2010. http://www.sportsci.org/resource/stats/

Jatto, O. E., Asia, I. O., Medjor, W. E. (2010): Proximate and Mineral Composition of Different Species of Snail Shell. Pacific Journal of Science and Technology, 11(1):416-419 (citirano prema Ademoroti, 1983)

Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A. B. (2007): Trace elements from soil to human, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 550 str.

Kobelja, K., Nemet, I., Župan, I., Čulin, J., Rončević, S. (2016): Elemental profiling of Noah's Ark shell (*Arca noae*, Linnaeus, 1758) by plasma optical spectrometry and chemometric tools. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 38: 157-164

Kobelja, K. (2016): Utjecaj matrice s visokim udjelom kalcija u emisijskoj plazma spektrometriji pri analizi elementnog profila školjki. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Lowenstam, H., Weiner, S. (1989): On biomineralization, Oxford University press, New York, str. 336

Lovrenčić, L. (2015): Molekularno-filogenetička i filogeografska analiza populacija vrste *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828) (Mollusca: Gastropoda) u Hrvatskoj. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Lydeard, C., Cowie, R. H., Bogan, A. E., Bouchet, P., Cummings, K. S., Frest, T. J., Herbert, D. G., Hershler, R., Gargominy, O., Perez, K., Ponder, W. F., Roth, B., Seddon,

M., Strong, E. E., Thompson, F. G. (2004): The global decline of non-marine mollusks. BioScience, 54: 321-330

Marciuš, B. (2017): Određivanje elementnih profila pripravaka ljekovitog bilja spektrometrijskim i kemometrijskim metodama. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Marin, F., Luquet, G., (2008): Unusually acidic proteins in biomineralization, Handbook of Biomineralization. Wiley Online Library, 273-290

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc Habdija, B. (1998): Beskralješnjaci. Biologija nižih beskralješnjaka, Školska knjiga, Zagreb

Medaković, D., Dolenec, T., Karlović, D., Vrhovnik, P., Rogan Šmuc, N., Rončević, S., Pitarević-Svedružić, L., Dolenec, M. (2015): Trace metals in fish biominerals as environmental indicators: handheld XRF analyses. Key Engineering Materials, 672: 328-339

Mierzwa, D. (2011): Chemical composition of shells of *Cepaea vindobonensis* (Ferussac, 1821.) (Gastropoda: Pulomanata: Helicidae) from localities with different substrata. Folia Malacologica, 19 (2): 97-101

Moog, O. (2002): Fauna Aquatica Austriaca, 2nd Edition Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium fur Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Vienna

Nelyubina, Y. V, Lyssenko, K. (2012): From “loose” to “dense” crystalline phases of calcium carbonate through “repulsive” interactions: an experimental charge-density study. Chemistry, 18: 12633-12636

Nölte, J. (2003): ICP Emission Spectrometry, A practical guide, Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Pfleger, V., Chatfield, J (1988): A guide to snails of Britain and Europe, Blitz Editions, Leicester

Pećina, M. (2006): Metode multivarijatne analize, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Ponder, W., Lindberg, D. R. (ur.) (2008): Phylogeny and Evolution of the Mollusca, University of California Press, Berkeley

Prohić, E. (1999): Geokemija, Targa, Zagreb

Rončević, S., Pitarević Svedružić, L., Smetiško, J, Medaković, D. (2010): ICP – AESanalysis of metal content in shell of mussel *Mytilus galloprovincialis* from Croatian coastal waters'. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 90(8): 620-632

Skoog, A., West, D., Holler, F. (1999): Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb

Skoog, A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007): Principles of Instrumental Analysis, 6th ed., Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA

Strong, E. E., Gargominy, O., Ponder, W. F., Bouchet, P. (2008): Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiologia, 595: 149-166.

Tomović, J., Novaković, B., Marković, V. (2013): Distribution of the snail *Amphimelania holandrii* Pfeiffer,1828 (Melanopsidae; Gastropoda) in Serbia in the 2009-2012 period. Water Research and Management, 3(4): 21-26

Toth, L. (2016): Emisijska plazma spektrometrija u analizi sorpcije kroma na nanočesticama željeza. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Vranković J., Labus-Blagojević S., Csanyi B., Makovinska J., Cvetković O., Gacic Z., Paunović M. (2012): Antioxidant enzymes and GST activity in natural populations of *Holandriana holandrii* from the Bosna River. Turkish Journal of Biology 36: 477-485

White, M., Chejlava, M., Fried, B., Sherma, J. (2007): The concentration of calcium carbonate in shells of freshwater snails. American Malacological Society, American Malacological Bulletin, 22(1): 139-142

Weiner, S., Addadi, L. (1997): Design strategies in mineralized biological materials. Journal of Materials Chemistry, 7: 689-702

Internetski izvori:

http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=754678 (pristupljeno: 14.4.2018.)

http://www.iucnredlist.org/details/156044 (pristupljeno: 26.5.2018.)

https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/f060b172-50dd-4904-9b8d-cb17ddd32179 (pristupljeno: 26.5.2018.)

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24.8.1994. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala sam u Svetom Ivanu Zelini. Srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam 2009. godine u Zagrebu, gdje sam završila Zdravstveno Učilište, smjer farmaceutski tehničar. U sklopu školske prakse mjesec dana radila sam u ljekarni „Zubović“ u Svetom Ivanu Zelini. Tijekom prakse usvojila sam znanje ljekarničke djelatnosti i detaljnije sam se upoznala s laboratorijskim radom. Godine 2014. upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet, nastavnički smjer biologije i kemije. Vrlo sam odgovorna i organizirana osoba što potvrđuje i moj angažman na projektu „Dan i noć na PMF –u“ unazad četiri godine. Komunikacijske i prezentacijske sposobnosti stekla sam tijekom raznih volonterskih poslova koji su uključivali rad s ljudima različitih profila. Od 2016. godine članica sam „Znanstvenih čarolija“, studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva u kojoj sam u suradnji s ostalima članovima 2017. godine sudjelovala na edukativnom programu BASF Kids' Lab - Malci genijalci koji je nastao pod vodstvom BASF Croatia d.o.o., čiju sam preporuku dobila za daljnji rad. Isto tako, članica sam sekcije „Mekušci“, udruge studenata biologije, BIUS, s kojom sam sudjelovala u istraživačko - edukacijskom projektu „Mura – Drava“, 2016. te "Insula Tilagus", 2017. godine. Nadalje, od 2016. do 2018. godine bila sam članica tima "Predavanja i radionice" i „Tima za popularizaciju znanosti", studentske organizacije eSTUDENT. Uz fakultet, obavljala sam razne studentske poslove te sam tako osmišljavala i pripremala dječje zabavne i edukativne radionice tijekom ljetnog kampa Gimnastičkog kluba Trešnjevka i provodila program znanstvene edukacije za djecu u Udruzi Bioteka. Poznajem engleski i osnove njemačkog jezika, a tijekom sudjelovanja na projektu "World in the City", 2017. godine, u organizaciji udruge AIESEC Zagreb, stekla sam osnovne kompetencije razumijevanja i govora turskog jezika. Poznajem rad na računalu (Microsoft Office Paket: Word, Excel, Powerpoint) te posjedujem vozačku dozvolu, B kategorija. Završila sam Vatrogasnu školu te time stekla uvjerenje o osposobljenosti, za zvanje „Vatrogasac“. Aktivno sudjelujem u radu DVD-a Donje Orešje, čija sam članica. U slobodno vrijeme volim se družiti s prijateljima i boraviti u prirodi.

PRILOZI

Tablica I. Rezultati deskriptivne statistike mjerenih morfoloških značajki i standardnih morfometrijskih omjera za vrstu *H. holandrii* (za objašnjenje kratica pogledati Tablicu 3)

	Cetina	Una	Maja	Korana	Kupa	Sutla	Drina	Nišava
VK (mm)	11,08 ± 0,82	14,49 ± 1,09	13,38 ± 0,89	15,45 ± 1,09	14,80 ± 1,32	14,84 ± 1,26	12,95 ± 1,64	11,90 ± 1,27
ŠK (mm)	7,96 ± 0,52	9,74 ± 0,62	8,16 ± 0,40	9,99 ± 0,66	9,91 ± 0,79	9,08 ± 0,74	8,61 ± 0,87	8, 17 ± 1,16
VU (mm)	7,39 ± 0,50	9,12 ± 0,66	8,06 ± 0,39	9,20 ± 0,67	9,10 ± 0,76	8,65 ± 0,73	8,32 ± 0,97	7,84 ± 0,59
ŠU (mm)	6,01 ± 0,92	7,07 ± 0,67	6,15 ± 0,67	7,04 ± 0,76	7,46 ± 0,87	6,75 ± 0,74	6,73 ± 0,76	6,46 ± 0,84
VZ (mm)	3,69 ± 0,53	5,36 ± 0,65	5,33 ± 0,68	6,24 ± 0,71	5,70 ± 0,81	6,19 ± 0,72	4,63 ± 0,92	4,07 ± 1,19
VPZ (mm)	9,84 ± 0,71	12,61 ± 0,88	10,30 ± 1,18	12,48 ± 0,92	12,71 ± 1,15	11,99 ± 1,00	10,20 ± 1,61	10,32 ± 1,24
M (g)	0,18 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,19 ± 0,03	0,28 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,12	0,19 ± 0,08
VK/ ŠK	1,39 ± 0,06	1,49 ± 0,10	1,64 ± 0,11	1,55 ± 0,77	1,49 ± 0,08	1,64 ± 0,06	1,50 ± 0,09	1,47 ± 0,08
VU/ ŠU	1,25 ± 0,17	1,30 ± 0,11	1,32 ± 0,13	1,32 ± 0,14	1,20 ± 0,24	1,30 ± 0,17	1,24 ± 0,13	1,23 ± 0,13
VU/ VK	0,67 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,11	0,58 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,66 ± 0,07
ŠU/ ŠK	0,75 ± 0,10	0,73 ± 0,07	0,76 ± 0,09	0,71 ± 0,08	0,73 ± 0,14	0,75 ± 0,10	0,78 ± 0,07	0,79 ± 0,04
VU/ ŠK	0,93 ± 0,04	0,94 ± 0,07	0,99 ± 0,05	0,92 ± 0,05	0,89 ± 0,17	0,95 ± 0,04	0,97 ± 0,05	0,97 ± 0,11
M/ VK	0,016±0,003	0,023±0,004	0,014±0,002	0,018±0,003	0,026±0,003	0,017±0,002	0,019±0,007	0,015±0,005