

Bioakumulacija teških metala u tkivu murine (Muraena helena L.) iz južnog Jadrana

Matković, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:879244>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petar Matković

**Bioakumulacija teških metala u tkivu murine
(*Muraena helena* L.) iz južnog Jadrana**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića u sklopu projekta (MB: 275-0010501-0856 / voditelja: prof. emmeritusa Boška Skaramuce. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja diplomiranog inženjera biologije - ekologije.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru prof. dr.sc. Domagoju Đikiću na pruženoj prilici, uloženom vremenu i trudu, ukazanom povjerenju, udijeljenim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem profesoru emmeritusu Bošku Skaramuci, Sveučilište u Dubrovniku i njegovom timu koji je omogućio prikupljanje uzoraka riba u Dubrovačkom akvatoriju.

Posebno se zahvaljujem dipl.ing. Jasenki Sabarić u analizi metala i doktorici Ani Mojsović koja je posredovala u analizi uzoraka.

Hvala svim prijateljima i rodbini koji su me trpjeli svih ovih godina. I Petri koja bi uvijek nešto fino skuhala.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Bioakumulacija teških metala u tkivu murine (*Muraena helena* L.) iz južnog Jadrana

Petar Matković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Murina (*Muraena helena* L.) mediteranska je vrsta ribe poznata iz antičkih vremena, zanimljiva sa biološkog, i komercijalnog stajališta. Zbog bentičkog i višegodišnjeg načina života, sedentarnog stila života, ograničene stope migracije zajedno s brzinom rasta i konzumiranjem širokog raspona vrsta na različitim trofičkim pozicijama, ova vrsta mogla bi biti zanimljiv potencijalni bioindikatorski organizam za proučavanje bentičkog zagađenja teškim metalima u Jadranu/Mediteranu. Ovim se radom nastoji pokazati kako se glavni rezidualni metali akumuliraju unutar različitih organa ove vrste. Murine su prikupljene u nezagađenom području Jadranskog mora, Elafiti-Dubrovnik u ljetnom i zimskom periodu. Cilj rada je pokazati bioakumulacijski potencijal različitih organa za metale Hg, As, Cd, Pb i odrediti koji organi bi bili najbolji za bioindikatorski potencijal nakupljanja metala iz morskog okoliša. U većini organa, osim srca, najveća je bioakumulacija tijekom ljetnog perioda. Iznimno u zimskom periodu, živa i arsen akumuliraju se najviše samo u mišićnom tkivu. Od svih istraživanih metala, promatramo li sve prikupljene uzorke riba bez obzira na sezonu, živa je najzastupljeniji akumulirani metal u svim organima osim srca i kože. Koža najviše nakuplja olovo. Arsen je drugi po zastupljenosti metal prisutan u većini organa osim jetre i škrge (u škrge je olovo jednako zastupljeno po postotnom udjelu). Iako je olovo treće po zastupljenosti u svim organima (osim škrge), postotni udio koncentracije u odnosu na druge metale nije zanemariv i relativno je visok. Najveće dosegnute prosječne koncentracije za živu su oko 0,5 mg/kg u jetri i oko 0,25 mg/kg u kostima, za arsen oko 0,2 mg/kg u škrge, za olovo oko 0,175 mg/kg u kostima a za kadmij 0,25 mg/kg u koži.

(38 stranica, 12 slika, 1 tablicu, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Murina, živa, arsen, olovo, kadmij

Voditelj: Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Doc. dr. sc. Renata Šoštarić

Izv. prof. dr. sc. Davor Zanella

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Heavy metal bioaccumulation in tissues of Mediterranean moray eel (*Muraena helena* L.) from southern Adriatic

Petar Matković
Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

Moray eel (*Muraena helena* L.) is a Mediterranean species of fish known from ancient times, interesting from a biological and commercial point of view, and due to its benthic and perennial lifestyle, sedentary lifestyle, limited migration rate along with growth rate and consumption of a wide range of species in different trophic positions, this species could be an interesting potential bioindicator for studying benthic heavy metal pollution in the Adriatic / Mediterranean. This paper shows how the major residual metals accumulate within different organs of this species. Moray eels were collected in the unpolluted area of the Adriatic Sea, Elafiti-Dubrovnik in summer and winter period. The aim of the work is to show the bioaccumulation potential of different organs for metals Hg, As, Cd, Pb and to determine which would be best for the bioindicative potential for the accumulation of metals from the marine environment. In most organs, except the heart, the highest bioaccumulation occurs during the summer. Exceptionally, in winter, mercury and arsenic accumulate most only in muscle tissue. Of all the metals studied, if we look at all collected samples regardless of season, mercury is the most represented accumulated metal in all organs except heart and skin. The skin mostly accumulates lead. Arsenic is the second most abundant metal present in most organs except liver and gills (in gills lead is equally abundant by percentage). Although lead is the third largest in all organs (except gills), the percentage concentration relative to other metals is not negligible and is relatively high. The highest average concentrations reached for mercury are about 0.5 mg/kg in the liver and about 0.25 mg/kg in the bones, for arsenic about 0.2 mg/kg in the gills, for lead about 0.175 mg/kg in the bones and for cadmium 0.25 mg/kg in the skin.

(38 pages, 12 figures, 1 table, 52 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: Moray eel, mercury, arsenic, cadmium, lead

Supervisor: Prof. Domagoj Đikić, PhD

Reviewers: Prof. Domagoj Đikić, PhD

Assist. prof. Renata Šoštarić, PhD

Assoc. prof. Davor Zanella, PhD

Thesis accepted:

KRATICE

BMDL	Benchmark Dose Level - statistička donja granica pouzdanosti referentnih doza
EFSA	European Food Safety Authority - Europska agencija za sigurnost hrane
FAO	Food and Agriculture Organization - Organizacija za prehranu i poljoprivredu
HAH	Hrvatska agencija za hranu
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
t.m.	tjelesna masa
TWI	Tolerable Weekly Intake - dopuštena količina tjednog unosa
WHO	World Health Organization - Svjetska zdravstvena organizacija

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Zagađenje metalima u morskom okolišu.....	2
1.1.1	Živa.....	2
1.1.2	Arsen	3
1.1.3	Kadmij	4
1.1.4	Olovo	4
1.2	Bioakumulacija metala u tkivima riba.....	5
1.2.1	Živa.....	5
1.2.2	Arsen	6
1.2.3	Kadmij	6
1.2.4	Olovo	7
1.3	Otrovnost metala akumuliranih u ribama za ljude.....	8
1.3.2	Arsen	8
1.3.3	Kadmij	8
1.3.4	Olovo	9
2	CILJ RADA	14
3	MATERIJALI I METODE	15
3.1	Prikupljanje uzoraka u vrste ribe mediteranske murine (<i>Muraena helena</i> L.)	15
3.2	Analiza metala.....	15
4	REZULTATI	18
4.1.	Koncentracije metala izmjerene u pojedinim organima u vrste ribe mediteranske murine (<i>Muraena helena</i> L.) ulovljenih u ljetnom i zimskom periodu	18
4.2.	Postotni omjeri ukupnih mjerenja koncentracije metala bioakumuliranih u pojedinim organima.....	24
5	RASPRAVA.....	30
6	ZAKLJUČCI	34
7	LITERATURA	35
8	ŽIVOTOPIS.....	39

1 UVOD

Murina (*Muraena helena* L.) mediteranska je vrsta ribe poznata iz antičkih vremena, zanimljiva kako iz biološkog, tako i iz komercijalnog stajališta.

Objavljeno je samo nekoliko radova koji opisuju različite aspekte biologije ove vrste. Primjerice, osnovne fiziološke činjenice, kao što su hematologija, prirast i prehrana tek su nedavno dokumentirane (Matić-Skoko i sur. 2011, Đikić i sur. 2013a, MatiĆ-Skoko i sur. 2014), ali neka važna pitanja kao što su reproduktivni ciklus i reproduktivno ponašanje nisu u potpunosti razjašnjeni.

Što se tiče prirasta i prehrane, istraživanja su pokazala da je ova vrsta visokog trofičkog indeksa i da konzumira velik broj vrsta (taksona). Plijen obuhvaća širok raspon vrsta od beskralješnjaka do morskih riba (Matić-Skoko i sur. 2014). Pored toga murina je zanimljiva i iz komercijalnih razloga jer je riba koja se samo povremeno konzumira, a koja bi mogla zauzeti važan status u restoranima više kategorije kao prehrambena namirnica, kako u mediteranskim zemljama tako i Hrvatskoj, posebice stoga jer ima relativno povoljan sastav nezasićenih masnih kiselina (Đikić i sur. 2017).

Osim komercijalnog i nutricionističkog interesa, temeljem navedenih bioloških podataka, zbog bentičkog i višegodišnjeg načina života, sedentarnog stila života, ograničene stope migracije zajedno s brzinom rasta i konzumiranjem širokog raspona vrsta na različitim trofičkim pozicijama, ova vrsta mogla bi biti i zanimljiv potencijalni bioindikatorski organizam za proučavanje bentičkog zagađenja i nakupljanja teških metala (ili drugih tvari koje onečišćuju okoliš) u Jadranu/Mediteranu.

Nema podataka o sustavnim istraživanjima ekotoksikologije na ovoj vrsti osim istraživanja organokloriranih pesticida i polikloriranih bifenila (Đikić i sur. 2013b). Primjerice ne postoje istraživanja bioakumulacije teških metala u kojem se koristi ova vrsta riba kao bioindikatorski organizam.

Ovim se radom nastojalo pokazati kako se glavni rezidualni metali (Hg, As, Cd, Pb) akumuliraju unutar različitih organa ove vrste. S obzirom da je mediteranska murina (*Muraena helena* L.) sedentarna vrsta sa visokim trofičkim statusom pretpostavili smo da bi bila dobar bioindikatorski organizam za utvrđivanje količine metala Hg, As, Cd, Pb koje prehranom i hranidbenim lancem nakuplja iz morskog okoliša.

1.1 Zagađenje metalima u morskom okolišu

Starija terminologija ekotoksikologije dijelila je okolišno prisutne metale prema relativnoj gustoći na lake, primjerice magnezij, aluminijski, i teške, primjerice živa, olovo, bakar, kobalt, cink, kadmij, mangan i dr. Iako se ova terminologija još ponegdje koristi kolokvijalno u znanstvenoj toksikološkoj literaturi, češća je podjela metala prema njihovoj sposobnosti vezivanja za druge elemente i kemijske skupine.

Metali su prirodno prisutni u morskim ekosustavima; u nižim koncentracijama mnogi su ključni za sam metabolizam riba. U obalnim vodama je koncentracija metala često puno viša, najviše zbog antropogenog utjecaja dok je na otvorenom moru koncentracija stabilnija. Stabilnost je posljedica prirodnih geokemijskih procesa, ali i akumulacije toksina u morskim organizmima. Apsorpcija teških metala iz otopine ovisi o raspoloživosti slobodnih metalnih iona. Oni su hidrofobni pa se moraju vezati s ligandima kako bi postali lipofilni i lako prelazili kroz stanične membrane. (Rainbow Philip 1984). Fiziološki razlikujemo esencijalne i neesencijalne teške metale. Esencijalni teški metali (bakar, cink, mangan, željezo, kobalt, krom) su neophodni za mnoge funkcije u organizmu, a njihov manjak može dovesti do pojave ozbiljnih simptoma nedostataka. Neesencijalni metali (kadmij, živa, olovo, srebro) nemaju ulogu u metabolizmima i u tragovima se mogu izlučiti iz organizma bez trajnih posljedica, dok akumulacija može dovesti do metaboličkih poremećaja. Teški metali u more dolaze iz prirodnih i antropogenih izvora. Primarni izvori ljudskog utjecaja su otpadne industrijske vode, ulijevanje slatkih voda zagađenih korištenjem neprikladnih pesticida u poljoprivredi, fosilna goriva te iskapanje i korištenje ugljena u industriji. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) istaknula je 10 kemikalija koje su velika prijetnja za javno zdravstvo, od kojih su četiri teški metali: kadmij, živa, olovo i arsen (Rainbow Philip 1984, Filipović 2015, Agencija za zaštitu okoliša 2014, Yarsan i Yipel 2013).

1.1.1 Živa

Živa (*Hg*) je ime je dobila od latinske riječi *hydrargyrum* što znači tekuće srebro (quicksilver). Živa je jedini metal koji je u tekućem stanju pri standardnim uvjetima tlaka i temperature. Živa se prirodno nalazi u okolišu u tragovima, no obično je sadržavaju prirodni minerali u bezopasnim količinama te ne predstavljaju značajan rizik za okoliš (Marnane 2018). Živa se nalazi u naslagama širom svijeta uglavnom kao cinabarit (živin sulfid). Crveni

pigment žive dobiva se mljevenjem cinabarita ili sintetičkog živinog sulfida (HgS). Elementarna živa se koristi u termometrima, barometrima, manometrima, tlakomjerima, živinim prekidačima, fluorescentnim žaruljama. Živini termometri i razni manometri uglavnom izlaze iz upotrebe zbog zabrinutosti od zagađenja okoliša i trovanja. Ostaje u upotrebi u fluorescentnim žaruljama i amalgamima kao zubnoj ispuni. Problem sa zagađenjem i nakupljanjem žive u okolišu posljedica je ljudskog djelovanja pri čemu se znatne količine žive ispuštaju u okoliš, a živa se potom u njemu zadržava slobodno kružeći tisućama godina (Marnane 2018). Današnji glavni izvori onečišćenja su rudarenje zlata, izgaranje ugljena u termoelektranama na kruta goriva i proizvodnja vinil-klorida, npr. Kina godišnje proizvede 1216 tona žive pri proizvodnji vinil-klorida (Kuenen i sur. 2018). Do otrovanja živom može doći direktnom ingestijom, udisanjem živinih para, kao i izlaganjem spojevima topivim u vodi, kao što su živin klorid ($HgCl_2$) ili metil-živa ($[CH_3Hg]^+$). Živa u vodi i sedimentu glavni je razlog za zabrinutost jer se ondje nalazi u iznimno toksičnom obliku, a životinje je tim putem lako mogu unijeti u organizam i na taj je način uvesti u ljudski prehrambeni lanac. (Marnane 2018)

1.1.2 Arsen

Arsen (As) čini 1,5 ppm Zemljine kore. Arsen i njegovi spojevi su otrovni i upotrebljavaju se kao insekticidi, zatim kod izrade pesticida, preparata za tretiranje drva i pigmenta za boje. Koristi se kao legura s olovom u akumulatorima i municiji. Prisutan je kao esencijalni element u tragovima kod štakora, hrčka, koze, kokoši, vjerojatno i nekih drugih. Međutim, trovanje arsenom događa se kod višestaničnih životnih oblika ako su količine veće nego što je potrebno. Kontaminacija podzemne vode arsenom problem je koji pogađa milijune ljudi širom svijeta. Arsen se koristio i u raznim poljoprivrednim insekticidima i otrovima. Na primjer, olovni vodikov arsenat ($PbHAsO_4$) bio je čest insekticid na voćkama (Peryea 1998). U drugoj polovici dvadesetog stoljeća prešlo se na manje otrovne oblike arsena, mononatrijmetilarsenat ($MSMA$) i dinatrijmetilarsenat ($DSMA$). Ovi organski arsenici postupno su ukinuti do 2013. godine u svim poljoprivrednim aktivnostima osim uzgoja pamuka. Arsen se koristio i kao dodatak hrani za uzgoj peradi i svinja, posebno u SAD-u, za povećanje debljanja, poboljšanje učinkovitosti hrane i za sprečavanje bolesti (Nachman i sur. 2005, Gray 2012).

U morskoj vodi arsen se javlja u anorganskim oblicima arsenata i arsenita, tako da su morski organizmi, zbog nemogućnosti izbjegavanja izloženosti toksičnim anorganskim oblicima arsena, razvili mehanizme biotransformacije i detoksikacije. To je rezultiralo nastankom više od 25 spojeva arsena unutar morskih sustava. Prema Gibbsu i sur. (1983), dokazano je da morski organizmi sadrže arsen u mnogo većim koncentracijama od kopnenih organizama, pri čemu kod nekih morskih vrsta koncentracija arsena premašuje 2000 µg/g suhe tvari.

1.1.3 Kadmij

U prirodi kadmija ima dvadeset puta manje nego žive.

Kadmij (*Cd*) (*lat. Cadmium*) spada u skupinu teških metala i klasificiran je kao kancerogen prve skupine koji negativno utječe na čovjeka i životinje. Svrstava se u zagađivače okoliša te se nalazi na osmome mjestu od dvadeset najopasnijih tvari (ATSDR 2012).

Mekan je i savitljiv metal koji se u okolišu prirodno javlja u neorganskom obliku, posljedično zbog vulkanskih emisija i trošenja stijena. Njegova se količina u vodi, tlu i živim organizmima povećava s antropogenim izvorima poput izgaranja ugljena, nafte, benzina, spaljivanja otpada, proizvodnjom i uporabom mineralnih gnojiva te naglim razvojem moderne tehnologije, pri čemu se kadmij koristi u CdSe/CdTe kombinacijama kod primjerice proizvodnje fotonaponskih solarnih ćelija i nanomaterijala (Lazarus 2010).

Povećanje razina kadmija u tlu posljedica je apsorpcije kadmija u biljkama koja se razlikuje između biljnih vrsta, pH i karakteristika tala. Posredno dolazi do unosa u životinje koje se tim biljkama hrane. Dakle iz tla se apsorbira u biljke, a prehrambenim lancem dalje prenosi i akumulira u životinjama i ljudima. Samo 4-6 % kadmija se iz tla prenese u vodu gdje se u sedimentima akumulira brže nego u biomu (Burger 2008). Glavni izvor kadmija u općoj populaciji je hrana, posebno žitarice (riža i pšenica), povrće, lignje, školjke i iznutrice, kao i duhanski dim.

1.1.4 Olovo

Olovo (*Pb*) u prirodi vrlo rijetko dolazi u elementarnom obliku, češće se nalazi u rudama, koje su lagane pa se olovo u takvom obliku zadržalo u zemljinoj kori, čini 14 ppm (Emsley 2011). Koristi se od davnina zbog podatnosti i niske temperature tališta, olovo je prvi metal u

povijesti za koji je poznato da se talio. Još su drevni Egipćani koristili olovo kao uteg za mreže u ribolovu (Winder 1993).

Više od 90 % olova u okolišu je rezultat prošlih antropogenih aktivnosti (Caurant i sur. 2006). Korištenje proizvoda koji sadrže olovo povećalo se od industrijske revolucije. Sama hlapljivost olova, povezana s raznim izvorima emisije, rezultirala je time da je olovo postalo onečišćivač globalnih razmjera. Nalazimo ga u tragovima u gotovo svakoj hrani. Pretpostavlja se da odrasla osoba apsorbira otprilike 10 % od svakodnevno unesenog olova u organizama. (Duraković i Labar 2000).

1.2 Bioakumulacija metala u tkivima riba

Koncentracija teških metala u ribljim tkivima reflektira njihovo prethodno izlaganje i zato su ribe dobri biomarkeri, čak i ako su razine metala dovoljno niske da ne štete njihovom zdravstvenom stanju. Riba mogu teške metale unijeti u svoj organizam direktno iz okoliša ili preko drugih morskih organizama s kojima se hrane, a budući da su sastavni dio ljudske prehrane, lako mogu te akumulirane metale prenijeti i na ljude.

Toksikanti se preko krvi transportiraju po cijelom tijelu, a zadržavaju najviše u masnim tkivima i jetri. Ionski i organski oblici metala su toksičniji i bolje se apsorbiraju, a posebno su osjetljivi organizmi u početnom stadiju razvoja – embriji i mlade jedinke (Rainbow Philip 1984, Filipović 2015, Agencija za zaštitu okoliša 2014, Yarsan i Yipel 2013).

1.2.1 Živa

Živa je u moru prisutna u vrlo malim koncentracijama. U morskim organizmima nakuplja se u obliku metil-žive $[CH_3Hg]^+$. Metil-živa nastaje iz anorganske žive (dospjele u more onečišćenjem), proizvode ju mikroorganizmi koji žive u otvorenim oceanima i sedimentima. Ponekad se dogodi onečišćenje direktno metil-živom (Minamata, Japan). Metil-živa ima sposobnost bioakumulacije u hranidbenim lancima. Vrlo lako se apsorbira u organizmu, međutim ekskrecija je vrlo spora jer nije solubilna i čvrsto se veže za proteine (Croteau i sur. 2005).

Morski organizmi, počevši od alga, unose živu u organizam u obliku metil-žive $[CH_3Hg]^+$ gdje se vremenom nakuplja. Preko zooplanktona i manjih nektonskih životnih oblika do većih riba penjući se hranidbenom mrežom, koncentracija metil-žive raste. Što se očituje kao sposobnost metil-žive da se biomagnificira, tako da na najvišoj razini hranidbene mreže može dostići i do milion puta veću koncentraciju od okolne vode (Lavoie i sur. 2013). Ribe koje žive dulje i visoko su u hranidbenom lancu imaju i veće koncentracije bioakumulirane žive.

1.2.2 Arsen

Arsen se može naći u morskoj vodi (2-4 ppb) i u rijekama (0,5-2 ppb). Polovina prisutnog arsena veže se na čestice. Slatkovodne i morske alge sadrže oko 1-250 ppm arsena, slatkovodni mikrofiti sadrže 2-1450 ppm, morski mekušci sadrže 1-70 ppm, morski rakovi 0,5-69 ppm, a ribe 0,2-320 ppm (sve vrijednosti temeljene su na suhoj masi). U nekim morskim organizmima, poput algi i škampa, arsen se može naći u organskim spojevima. Morske životinje izložene su arsenu kroz svoju prehranu, tako da količina i koncentracije arsenovih spojeva ovise o njihovom plijenu. U morskim se životinjama akumuliraju male koncentracije anorganskog arsena. Razina arsena u morskim vodama otvorenih mora su 1-2 $\mu\text{g/L}$. U dubljim vodama arsen je prisutan kao anorganski arsenat. U višim površinskim slojevima, unutar kojih prodire dovoljno svjetla za fotosintezu, provodi se redukcija i metilacija mikroorganizama. Uz As (V) oblik, površinske vode sadrže i As (III), MA i DMA u malim količinama (Borak i Hosgood, 2007)

1.2.3 Kadmij

Akvatični organizmi mogu biti kontaminirani zbog povećane razine kadmija u vodi. U odnosu na razine kadmija kod slatkovodnih organizama, razine kadmija su više kod morskih organizama, posebice kod školjkaša i rakova. Akumulacija kadmija odvija se ponajprije u jetri, crijevima i bubrezima riba (Kraal i sur. 1995; Berntssen i sur. 2001).

Kada koncentracija kadmija prijeđe 3 mg/kg u slatkovodnoj vodi, 4,5 mg/kg u morskoj vodi, 1000 $\mu\text{g/kg}$ u prehrani, ili 100 mg/m^3 u zraku javlja se štetno djelovanje u ribama i divljim životinjama (Burger 2008). Značajan izvor kadmija u ljudskoj prehrani mogu biti glavonošci, a predatori koji ih konzumiraju pokazuju visoku razinu ovog metala u ciljnim organima. Glavonošce jedu mnoge morske životinje, kao što su morski sisavci, ptice i ribe. Matić-Skoko

i sur. (2011 i 2014), pokazala je da glavonošci čine znatan udio plijena murine. Za više od 80 % odontocete vrsta (Monodontidae, Phocaenidae, Delphinidae, Stenidae) glavonošci su redovita prehrana (Bustamante i sur. 1998).

1.2.4 Olovo

Biljke i životinje mogu biokoncentrirati olovo, ali do njegovog biomagnificiranja u prehrambenom lancu ne dolazi, što se dijelom objašnjava činjenicom da se u kralježnjaka olovo pohranjuje uglavnom u kostima, što smanjuje rizik od prijenosa olova na druge organizme kroz hranidbeni lanac (Tukker i sur. 2001). Organizmi inkorporiraju olovo iz okoliša razmjerno stupnju onečišćenja okoliša.

Unos olova kod riba doseže ravnotežu tek nakon nekoliko tjedana izloženosti. Zbog adsorpcije, koncentracije olova su veće u škragama i koži, no olovo se akumulira i u jetri, bubrezima i kostima, dok se u mišićnom tkivu ne akumulira (Somero i sur. 1977).

S povećanjem starosti organizama povećava se razina olova u jetri. Iako se olovo nalazi u različitim oblicima u kopnenim i morskim vodama, najviše ga možemo pronaći u anorganskom obliku vezanom za bjelančevine u riba. Za razliku od anorganskih spojeva olova, organificirano olovo, primjerice tetraalkil olovo, se brže unosi, ali i brže uklanja iz riba (WHO/IPCS 1989).

Kod vodenih organizama unos i nakupljanje olova iz vode odvija se pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika. Kod onečišćenih vodenih sustava gotovo cjelokupna količina olova čvrsto je vezana za sediment, dok je samo manji dio otopljen u vodi u međuprostoru između sedimentnih čestica. Distribucija olova je u životinja povezana s metabolizmom kalcija. Kod školjkaša je koncentracija olova viša u ljušturama bogatim kalcijem nego u mekim tkivima, naravno ovisno o prisutnoj količini olova u okolnoj vodi ili sedimentu (Dietz i sur. 1996).

1.3 Otrovnost metala akumuliranih u ribama za ljude

1.3.1 Živa

Ribe i mekušci koncentriraju živu u tijelu u obliku metil-žive $[CH_3Hg]^+$. Najznačajniji izvor unosa žive u ljudski organizam je putem morskih plodova. Biomonitoring populacije u New Yorku također je pokazao da su koncentracije žive više u potrošača morskih plodova i ribe (McKelvey i sur. 2010). Utjecaji na zdravlje povezani su s doziranjem, no glavni je problem utjecaj žive na nerođenu i mlađu djecu. Do izloženosti živi može doći već u utrobi zbog majčine konzumacije morskih plodova. To može imati znatan i doživotan učinak na mozak u razvoju i živčani sustav djeteta te utjecati na pamćenje, jezične sposobnosti, moć opažanja i druge vještine. (Marnane 2018)

1.3.2 Arsen

Anorganski se arsen u morskoj vodi biotransformira u organske spojeve uz pomoć morske biote. U globalnom kruženju arsena morski okoliš ima značajnu ulogu. Morske su alge te koje akumuliraju anorganski arsen iz mora i transformiraju ga do arsenobetaina kroz morski hranidbeni lanac (Kubota i sur. 2002).

1.3.3 Kadmij

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) u svom znanstvenom izviješću o prehrambenoj izloženosti europske populacije kadmiju, navodi podatke da se specifični relativni doprinos (%) kategorije hrane „riba i drugi morski plodovi“ ukupnoj donjoj granici izloženosti kod odraslih konzumenata kreće od minimalno 1,20 % do maksimalno 31,2 % (EFSA 2012). Specifični relativni doprinos (%) pojedinih vrsta unutar navedenog ukupnog udjela kategorije hrane „riba i drugi morski plodovi“ iznosi za riblje meso 33,3 %; rakove 16,8 %; glavonošce 44,1 %; riblje proizvode 2,2 %; iznutrice 0,6 %; vodozemce, gmazove, puževe i kukce 0,6 % te nespecificirane akvatične organizme 2,5 % (EFSA 2012). Koristeći sveobuhvatnu bazu podataka konzumacije hrane, u kojoj se nalaze podaci o prehrambenim navikama većine europskih zemalja, EFSA je procijenila kako trenutna prosječna izloženost odraslog dijela populacije iznosi 1,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t. m. tjedno (medijan, a sa rasponom od 1,50 do 2,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase tjedno). Kod 95 % odraslog dijela populacije prosječna izloženost iznosi 3,13

$\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase tjedno (medijan, a sa rasponom od 2,47-4,81 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase tjedno) (EFSA 2012). Sapunar-Postružnik i sur., (1996) navode kako prosječni unos kadmija u Republici Hrvatskoj iznosi 17,3 $\mu\text{g}/\text{osoba}/\text{dan}$ odnosno 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase/dan za osobu tešku 70 kg, dok Blanuša i sur. (1991), kao prosječni unos kadmija navode 8,5 $\mu\text{g}/\text{osobi}/\text{dan}$ tj. 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase/dan.

1.3.4 Olovo

Olovo mijenja funkciju i strukturu bubrega, kosti, središnjeg živčanog sustava, i hematopoetskog sustava, te proizvodi štetne biokemijske, histopatološke, neuropsihološke, fetotoksične, teratogene, i reproduktivne učinke (Eisler 2009). Toksičnost se razlikuje ovisno o starosnoj dobi. Najosjetljivija populacija su djeca, posebno mala djeca, dojenčad u neonatalnom periodu i fetus. Kako se u čovjeku olovo akumulira ponajprije u koštanom tkivu, ono se postepeno otpušta iz koštanog tkiva natrag u krvotok, posebice tijekom fizioloških ili patoloških razdoblja demineralizacije kostiju, kao što su trudnoća, dojenje i osteoporoza. Olovo u organizmu utječe na gotovo svaki sustav u ljudskome tijelu, no najosjetljivije tkivo za olovo je središnji živčani sustav, posebice mozak u razvoju. Olovo štetno djeluje na kognitivni razvoj u djece. Godine 2010. JECFA (engl. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) je potvrdio da neurotoksičnost olova smanjuje dječji IQ.

Procjenjuje se da je prosječna životna izloženost euroljana olovu 0,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase dnevno. Izloženost je najviša kod djece do 3 godine (1,32 i 1,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase dnevno), dok je kod odraslih taj broj procijenjen na 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase dnevno (EFSA 2012).

U EFSA-inom znanstvenom mišljenju o olovu, u kojem je prikupljeno i obrađeno 140000 rezultata iz 14 zemalja članica Europske Unije i Norveške, EFSA navodi kako prosječna koncentracija olova za svu ribu i hranu porijeklom iz mora iznosi 0,0543 mg/kg (EFSA 2010). U SCOOP studiji, u kojoj su na prisutnost olova analizirani uzorci hrane u 10 europskih zemalja, koncentracije olova u ribi i ribljim proizvodima varirale su rasponu između nedetektiranog olova do 0,550 mg/kg (SCOOP 2004).

1.4 Zakonom dopuštene granične vrijednosti metala Hg, As, Cd, Pb u EU i Hrvatskoj

Zakonom o kontaminantima (NN 39/13), obvezan provedbom Uredbe Komisije (EZ) br. 1881/2006, ažurirane 2015., propisane su najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani u Republici Hrvatskoj u cilju zaštite zdravlja potrošača. Navedenom Uredbom i njenim izmjenama određene su najveće dopuštene količine žive, kadmija i olova u ribi, rakovima i školjkašima te glavonošcima.

Najveća dopuštena količina žive, određena navedenom Uredbom, iznosi 0,5 mg/kg za proizvode ribarstva i mišićno meso ribe, osim određenih vrsta koje su navedene tom Uredbom, među kojima nema murine (*Muraena helena*), na kojoj se uglavnom nalaze vrste koje su pri vrhu hranidbene mreže, za koje propisana najveća dopuštena količina iznosi 1,0 mg/kg.

Najveća dopuštena količina kadmija određena navedenom Uredbom, iznosi 0,05 mg/kg za mišićno meso ribe, gdje bi se ubrojila i vrsta promatrana u ovom radu *Muraena helena*; za određene vrste koje su navedene tom Uredbom iznosi 0,1 mg/kg; za mišićno meso sabljarko (*Xiphias gladius*), sardine (*Sardina pilchardus*) i inćuna (*Engraulis species*) iznosi 0,25 mg/kg; za školjkaše i glavonošce bez utrobe iznosi 1,0 mg/kg.

Najveća dopuštena količina olova određena navedenom Uredbom, iznosi 0,3 mg/kg za mišićno meso riba; za školjkaše iznosi 1,5 mg/kg; za glavonošce bez utrobe iznosi 1,0 mg/kg. Najveće dopuštene količine arsena navedenim Zakonom, odnosno Uredbom nisu određene. Iako na razini Europske unije ne postoje zakonski određene najveće dopuštene količine arsena u hrani, pojedine države članice Europske unije su nacionalnim zakonodavstvom odredile najveće dopuštene količine u pojedinim vrstama hrane. U Republici Hrvatskoj za sada takav zakon nije donesen.

Prema podacima Hrvatske agencije za hranu, tijekom 2012. i 2013. godine ukupno je analiziran 161 uzorak ribe, glavonožaca, rakova i školjkaša. Koncentracije žive, kadmija, olova i arsena u jestivom dijelu istraživanih akvatičnih organizmima prikazane su u Tablici 1. kao medijan te 5. i 95. percentil.

Analize su sukladno prijašnjim saznanjima dokazale da su koncentracije toksičnih elemenata kod različitih vrsta riba i ostalih organizma različite.

Tablica 1. Koncentracije Hg, Pb, Cd i As (mg/kg mokre težine) u jestivim dijelovima analiziranih akvatičnih organizama.

Vrsta uzorka	n	Hg Medija n (P5 – P95)	Pb Medija n (P5 – P95)	Cd Medija n (P5 – P95)	As Medija n (P5 – P95)
Slatkovodna riba	39	0,038 (0,012-0,684)	0,051 (0,050-0,0562)	0,012 (0,010-0,020)	0,074 (0,051-0,279)
Morska riba	94	0,095 (0,024-1,32)	0,052 (0,050-0,061)	0,011 (0,010-0,014)	0,158 (0,041-4,786)
Rakovi i školjkaši	8	0,025 (0,020-0,050)	0,051 (0,05-0,668)	0,065 (0,01-0,287)	0,053 (0,028-0,499)
Glavonošci	20	0,078 (0,012-0,384)	0,053 (0,050-0,063)	0,031 (0,011-1,405)	3,51 (0,278-54,38)

n: broj uzoraka; P5: peti percentil; P95: devedesetpeti percentil

Preuzeto iz: Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske. Hrvatska agencija za hranu HAH-Z-2014-2

Živa

Iz procijenjene prosječne tjedne izloženosti metil-živi visokih konzumenata odrasle populacije Republike Hrvatske, koja se kreće od 0,035 do 0,409 $\mu\text{g Hg/kg t.m.}$ tjedno, vidljivo je kako se takva izloženost nalazi znatno ispod utvrđene vrijednosti TWI (Tolerable Weekly Intake - Dopuštena količina tjednog unosa) od 1,3 $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase te da je rizik za zdravlje potrošača zanemariv. Rizik za zdravlje prosječnih konzumenata akvatičnih organizama još je zanemariviji jer se procijenjena prosječna tjedna izloženost metil-živi kod njih kreće u rasponu od 0,01 do 0,07 $\mu\text{g Hg/kg t.m.}$ tjedno što je daleko ispod utvrđene vrijednosti TWI.

Iz procijenjene prosječne tjedne izloženosti anorganskoj živi visokih konzumenata odrasle populacije Republike Hrvatske, koja se kreće od od 0,023 do 0,144 $\mu\text{g Hg/kg t.m.}$ tjedno, vidljivo je kako se takva izloženost nalazi znatno ispod utvrđene vrijednosti TWI od 4 $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase te da je rizik za zdravlje potrošača zanemariv. Rizik za zdravlje prosječnih konzumenata akvatičnih organizama još je zanemariviji jer se procijenjena prosječna tjedna izloženost anorganskoj živi kod njih kreće u rasponu od 0,002 do 0,013 $\mu\text{g Hg/kg t.m.}$ tjedno što je daleko ispod utvrđene vrijednosti TWI (HAH 2014).

Olovo

Vrijednosti prehrambene izloženosti olovu visokih i prosječnih konzumenata akvatičnih organizama odrasle populacije Republike Hrvatske manje su od utvrđenih vrijednosti BMDL za štetne učinke na sistolički krvni tlak (1,50 µg/kg t.m./dan) i BMDL Benchmark Dose Level (statistička donja granica pouzdanosti referentnih doza) unosnih vrijednosti za prevalenciju štetnih učinaka na kronične bolesti bubrega (0,63 µg/kg t.m./dan) (HAH 2014).

Kadmij

Procijenjena prosječna prehrambena izloženost kadmiju kod visokih konzumenata akvatičnih organizama u odrasloj populaciji Republike Hrvatske kreće se od 0,047 do 0,115 µg Cd/kg tjelesne težine tjedno. Kod prosječnih konzumenata akvatičnih organizama koji pripadaju istom dijelu populacije prehrambena izloženost kadmiju kreće se od 0,001 do 0,007 µg Cd/kg tjelesne mase tjedno (HAH 2014).

Kod visokih i prosječnih konzumenata akvatičnih organizama koji pripadaju odrasloj populaciji Republike Hrvatske prosječna prehrambena izloženost kadmiju nalazi se znatno ispod granične vrijednosti od 2,5 µg/kg tjelesne mase tjedno (HAH 2014).

Arsen

Procijenjene vrijednosti prehrambene izloženosti As visokih konzumenata akvatičnih organizama odrasle populacije Republike Hrvatske kreću se od 0,018 do 0,053 µg/kg t.m./dan dok se kod prosječnih konzumenata vrijednosti prehrambene izloženosti As kreću od 0,001 do 0,003 µg/kg t.m./dan. Navedene vrijednosti nalaze se ispod raspona utvrđenih vrijednosti BMDL za kožne lezije (2,2-5,7 odnosno 0,93-3,7 µg/kg t.m./dan), karcinom pluća (0,34-0,69 µg/kg t.m./dan) i karcinom mokraćnog mjehura (3,2-7,5 µg/kg t.m./dan) (HAH 2014).

Prema „Izvešću o stanju okoliša u Republici Hrvatskoj (razdoblje od 2009. - 2012.)“ Agencije za zaštitu okoliša, iz 2014. godine stanje na Jadranskoj obali je ocijenjeno najvišim stupnjem kakvoće. Prema njihovim podacima, stupanj eutrofikacije kao mjere onečišćenosti se nije mijenjao od 2005. godine te je stanje na gotovo cijelom Jadranu ocijenjeno kao „vrlo dobro“ s tek par dijelova priobalnog mora u Šibenskom i Bakarskom zaljevu koji imaju ocjenu „dobro“. U odnosu na prethodno izvještajno razdoblje (2005. - 2008.) povećale su se

prosječne vrijednosti kadmija, kroma, olova i cinka u morskim organizmima, dok su razine bakra i žive ostale iste. Ove procjene donesene su temeljem praćenja polutanata i koncentracije metala u školjkašima *Mytilus galloprovincialis*. Uzroci onečišćenja su nedovoljno kontrolirana industrijska proizvodnja uz obalu te ispuštanje otpadnih voda u more, korištenje nedozvoljenih kloriranih pesticida u poljoprivredi koji su rijekama i ispiranjem došli do mora te u manjoj mjeri, ispuštanje komunalnih otpadnih voda u priobalnom području. Razlozi za brigu se ne spominju, a predlaže se češće i sustavnije izvođenje mjerenja kako bi se dobili što točniji i temeljitiji rezultati (Agencija za zaštitu okoliša 2014).

2 CILJ RADA

Pokazati bioakumulacijski potencijal različitih organa mediteranske murine (*Muraena helena* L.) za metale Hg, As, Cd, Pb iz morskog okoliša

Temeljem bioakumulacijskog potencijala pojedinih organa mediteranske murine (*Muraena helena* L.) za metale Hg, As, Cd, Pb, odrediti koji bi bili najbolji za bioindikatorski potencijal nakupljanja metala iz morskog okoliša

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Prikupljanje uzoraka u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.)

Prikupljanje životinja

Murine su prikupljene na istoj lokaciji ljeti (kolovoz 2009.) i zimi (siječanj 2010.) u Jadranskom moru, u blizini Elafitskih otoka kod Dubrovnika, Hrvatska (koordinate 42.761019°N, 17.765090°W.). Na dubini od 5-10 m parangalskim udicama ukupno je ulovljeno 9 riba po svakom izlasku na teren (ukupno ljeti i zimi, N = 18). Analizirano je ukupno 18 riba. Sve ribe su uhvaćene (200 metarskim parangalima) istog dana na svakom izlasku na teren (ljet/zima) kako bi se osigurala analiza u približno istim uvjetima okoline i da je uzorak reprezentativan uniformnošću. Uzimajući u obzir noćne navike vrste, udice su postavljene u 03:00 ujutro i prikupljene dva sata kasnije. Sve ribe izgledale su zdravo i vrlo agilno (aktivno-agresivne).

Svaka riba je pojedinačno uspavana uranjanjem do 15 minuta u otopinu anesteika MS222 (Sigma) u zasebnoj plastičnoj bačvi od 100 L u oksigeniranoj morskoj vodi (MS222 doza = 250 mg L⁻¹ morske vode u spremniku). Nakon uspavlivanja, izmjereni su morfometrijski parametri (DT = duljina tijela, TM = tjelesna masa, VO = ventralni opseg, KO = kaudalni opseg). Riba su žrtvovane trenutnom dekapitacijom.

Iz svake ribe uzeti su unutarnji organi i dijelovi repa, mjereno 10 cm od anusa prema repu, uključujući mišićno tkivo i kožu za detekciju metala. Uzorci su vagani odmah nakon uzorkovanja i zamrznuti na -18 °C do daljnje obrade u laboratoriju.

3.2 Analiza metala

Predobrada teških metala

Deionizirana voda iz Milli-Q sustava (Millipore, Bedford, MA, USA) je korištena za pripremu svih vodenih otopina. Korištene su mineralne kiseline i oksidanti (HNO₃ i H₂O₂) najviše kvalitete (Suprapure, Merck, Darmstadt, Njemačka). Sva plastika i stakleno posuđe su

očišćeni namakanjem, preko noći u 10 % otopini dušične kiseline i zatim isprani deioniziranom vodom.

Razgradnja tkiva (digestija) uz pomoć mikrovalova

Za mikrovalnu digestiju uzoraka tkiva murine korišten je Anton Paar MULTIWAVE 3000 mikrovalni sustav za pripremu uzoraka s Rotorom 6MF100. Homogenizirani uzorci murine su postavljeni izravno u unutarnju posudu (Liner MF100) izrađenu od trifluormetilena TFM koji može podnijeti maksimalni volumen od 50 ml, radni tlak od 20 bara i maksimalni tlak od 75 bara. Reakcijske posude su očišćene prije svake digestije pomoću 5 ml HNO₃ (65 %) zagrijavane 30 min na 1000 W.

Uzorci (2,0 g) su razgrađeni (digestirani) s 5 ml HNO₃ (65 %) i 2 ml H₂O₂ (30 %) u mikrovalnom digestijskom sustavu tijekom 30 minuta i razrijeđeni do 25 ml deioniziranom vodom. Digestija na slijepom uzorku je provedena na isti način (uvjeti digestije za mikrovalove su bili: 10 min pri 250 W s rampom, 10 min pri konstantnih 1000 W i odzračivanje 10 min). Vrijednosti oporavka bile su gotovo kvantitativne (> 95 %) za gornju metodu digestije.

Uređaji i reagensi

Za određivanje elemenata analita Pb, Cd i As korištena je Perkin-Elmer Analyst 600 Zeemanova atomska apsorpcijska spektrometrija opremljena s THGA-600 grafitnom peći. Korišten je AS-60 furnace autosampler. Instrumentalni parametri su podešeni prema preporukama proizvođača. Hg je određen pomoću DMA-80 (Direct Mercury Analyzer, Milestone) za izravno određivanje ukupne žive bez potrebe za predobradom uzorka s kiselim mikrovalnom digestijom.

Pb i Cd u uzorcima određivani su pomoću THGA grafitne peći, koristeći argon kao inertni plin. Korištene su pirolitički obložene grafitne cijevi s platformom i signali su mjereni kao vršno područje za Cd i Pb. Za As mjerenja su provedena u zrak/acetilen plamenu.

Standardne otopine Pb 5,0 mgL⁻¹, pripremljene su iz CRM 1001 ± 2 mgL⁻¹ (Merck).

Standardne otopine Cd 1,0 mgL⁻¹, pripremljene su iz CRM 1002 ± 5 mgL⁻¹ (Merck).

Standardna otopina As 10,0 mgL⁻¹, pripremljena je iz CRM 1001 ± 5 mgL⁻¹ (Merck).

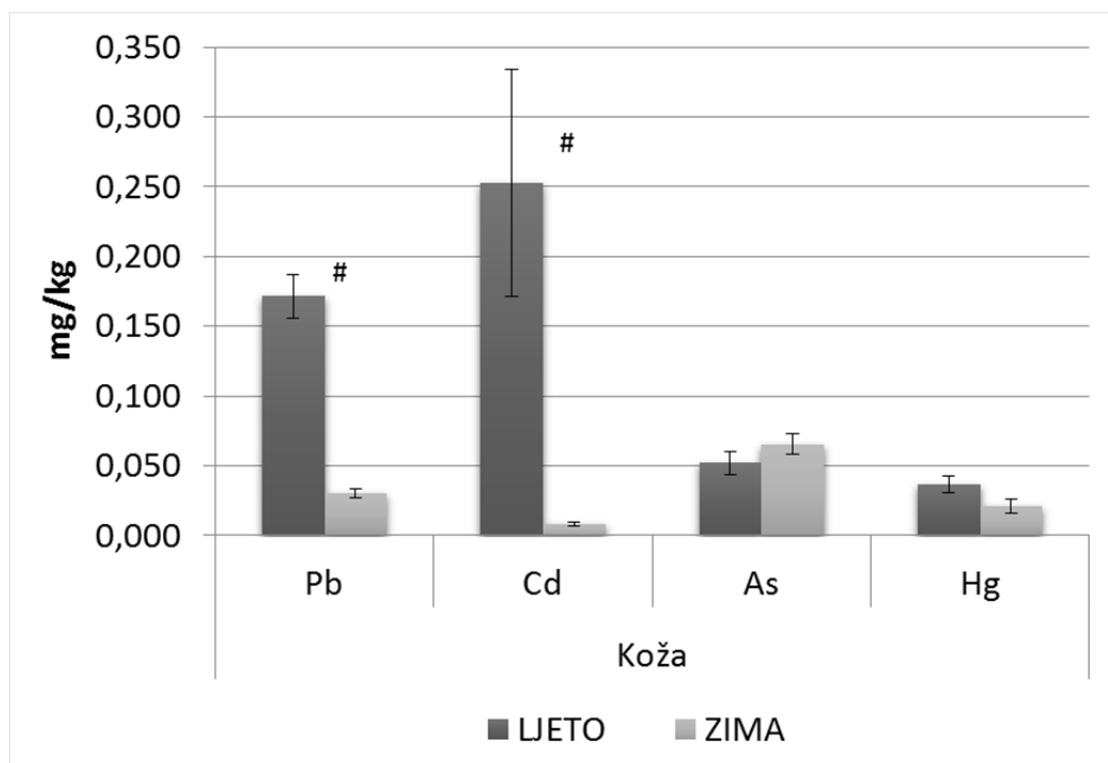
Radne otopine su pripravljene svakodnevno daljnjim razrjeđivanjem s 0,2 % HNO₃.

Kao modifikatori korišteni su magnezij nitrat i amonij fosfat. Izmjerene valne duljine bile su 228,8 nm za Cd, 283,3 nm za Pb, 193,7 nm za As i 253,7 nm za Hg, dok su granice detekcije atoma apsorpcijske spektrometrije 0,05 (Pb), 0,3 (Cd), 0,2 (As) i 20 (Hg) μgL^{-1} . Sva ispitivanja provedena su u akreditiranom laboratoriju prema normi ISO/IEC 17025:2005, čime je osigurana kvaliteta dobivenih rezultata. Zajedno s točnošću, ispitivana je ponovljivost pripreme uzorka (intra-test preciznost) i izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) devet određivanja (tri koncentracije u tri ponavljanja). Točnost metode korigirana je standardnim referentnim materijalom (riblji protein Protein NRC-CNRC DORM-3).

Ponovljivost mjerenja (instrumentalna preciznost) procijenjena je ponavljanjem (n=10) mjerenja signala apsorpcije na istom uzorku ribe, a dobivene vrijednosti RSD su bile zadovoljavajuće.

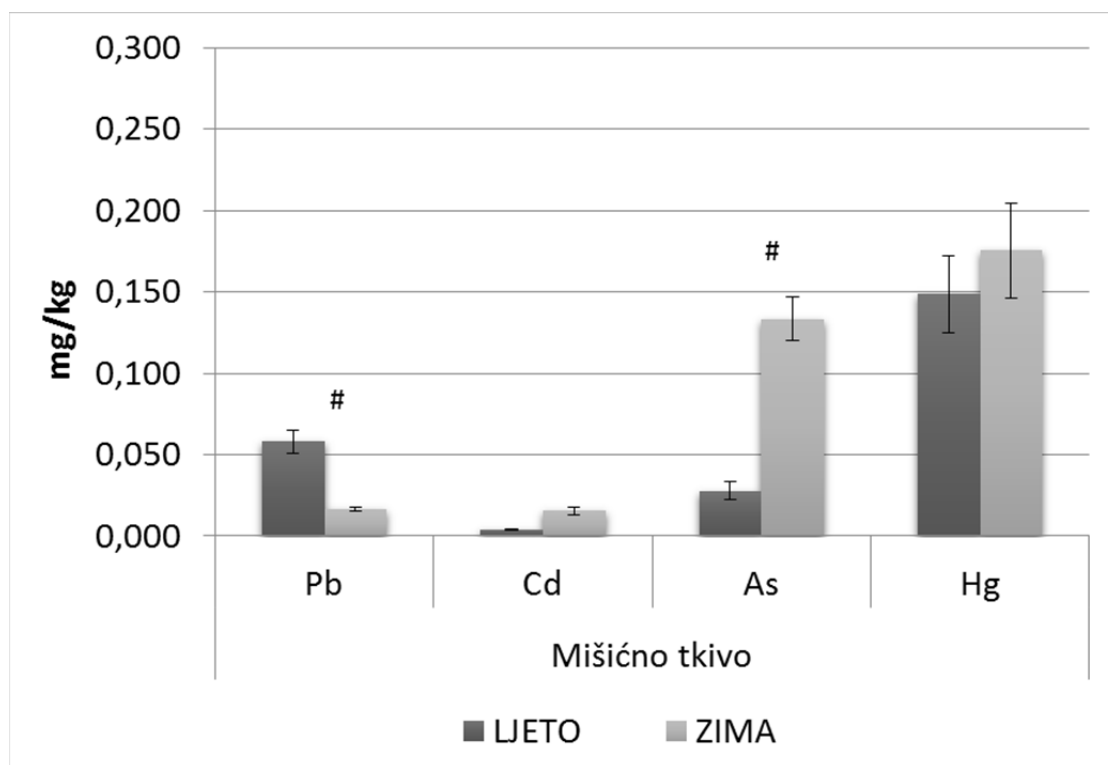
4 REZULTATI

4.1. Koncentracije metala izmjerene u pojedinim organima u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) ulovljenih u ljetnom i zimskom periodu



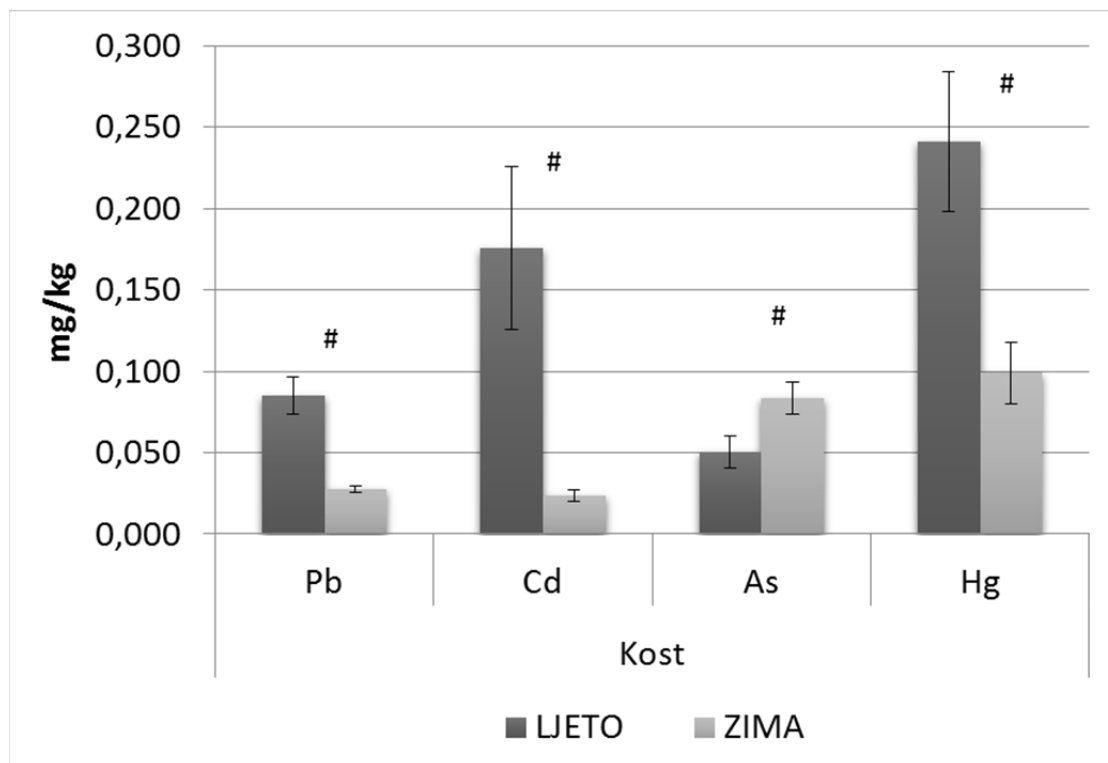
Slika 1. Koncentracije Pb, Cd, As, Hg u u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) u ljetnom (N= 9) i zimskom periodu (N= 9). # Statistički značajno različito ($p \leq 0.05$) između godišnjih doba za svaki pojedini analizirani metal

Slika 1. prikazuje koncentracije teških metala izmjerene u koži murine, u ljetnom i zimskom periodu. Uočljivo je da je kadmij najviše bioakumuliran. Drugi metal po koncentraciji je olovo. Također možemo vidjeti da koncentracije bioakumuliranih kadmija i olova pokazuju izražajne sezonske razlike. Koncentracija kadmija u ribama ulovljenim u ljetnom periodu je za približno 0,25 mg/kg tkiva veća nego u ribama ulovljenim u zimskom periodu. Dok je koncentracija olova za približno 0,15 mg/kg veća u ljetnom periodu u odnosu na zimski. Koncentracije bioakumuliranih arsena i žive znatno su niže (oko 0,05 mg/kg tkiva) i ne pokazuju značajne sezonske razlike. S time da je koncentracija arsena nešto viša u zimskom periodu.



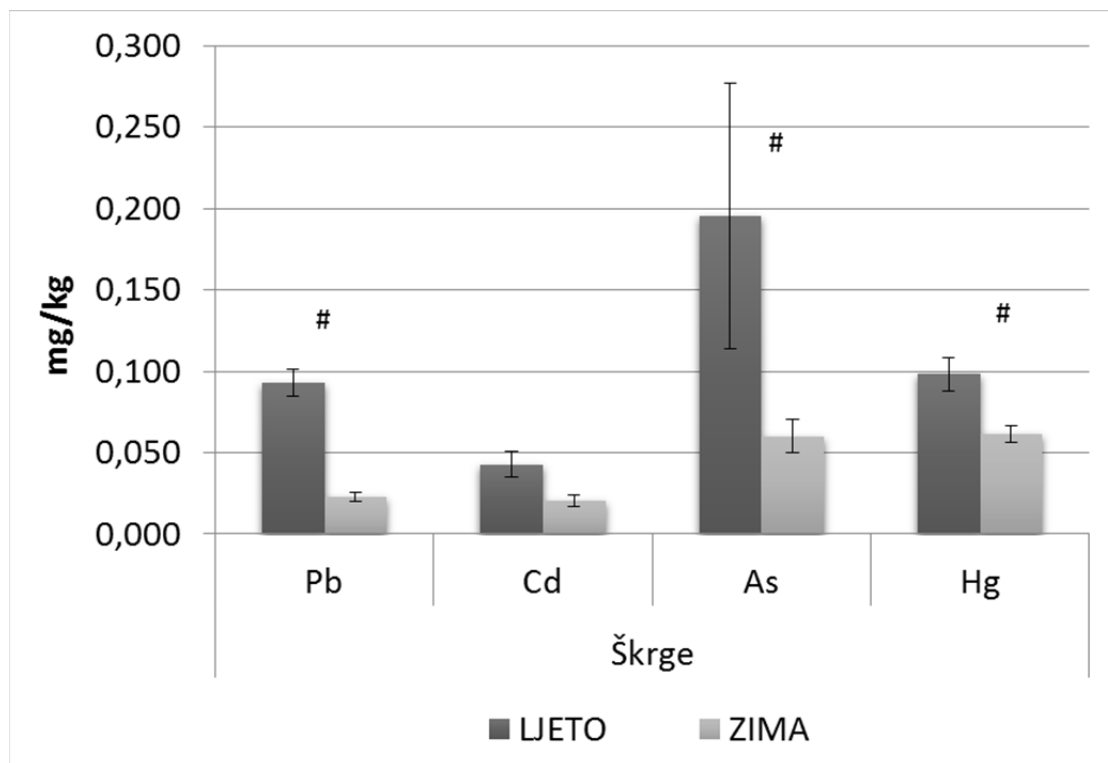
Slika 2. Koncentracije Pb, Cd, As, Hg u mišićnom tkivu u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) u ljetnom (N= 9) i zimskom periodu (N= 9). # Statistički značajno različito ($p \leq 0,05$) između godišnjih doba za svaki pojedini analizirani metal

Slika 2. prikazuje koncentracije teških metala u mišićnom tkivu murina ulovljenih u ljetnom i zimskom periodu. Iz grafikona je vidljivo da je bioakumulirana koncentracija žive najveća i podjednaka u oba perioda prikupljanja uzoraka. Dok koncentracija arsena pokazuje izraženiju sezonsku razliku. Koncentracija bioakumuliranog arsena u zimskom periodu približno je jednaka koncentraciji žive (0,15 mg/kg tkiva) dok je u mišićnom tkivu riba prikupljenih ljeti sličnija koncentracijama bioakumuliranih kadmija i olova (ne prelazi 0,05 mg/kg). Koncentracija arsena ne pokazuju znatne sezonske razlike. Još treba primijetiti da je jedino koncentracija olova izmjerena u mišićnom tkivu riba ulovljenih u ljetnom periodu veća u odnosu na zimu dok su ostali metali više nakupljeni zimi.



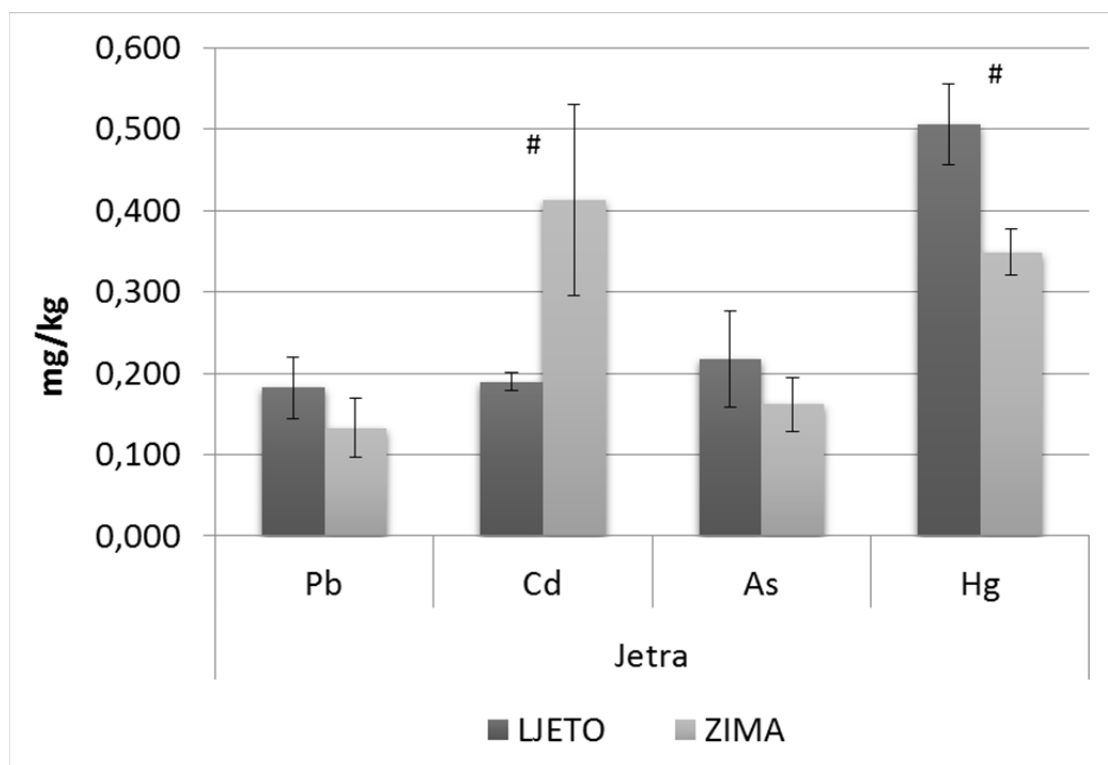
Slika 3. Koncentracije Pb, Cd, As, Hg u kostima u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) u ljetnom (N= 9) i zimskom periodu (N= 9). # Statistički značajno različito ($p \leq 0,05$) između godišnjih doba za svaki pojedini analizirani metal

Slika 3. prikazuje bioakumulaciju teških metala u kostima murina. Uočljivo je da su olovo, kadmij i živa u znatno višoj koncentraciji u ljetnom periodu, u odnosu na zimski period. Dok je kod arsena nešto veća koncentracija mjerena zimi. Koncentracije bioakumuliranih žive i kadmija pokazuju znatne sezonske razlike, za oko 0,15 mg/kg veća je u ljetnom periodu. No gledajući omjerno koncentracija kadmija je 7x veća u ljetnom periodu u odnosu na zimski, dok su koncentracije bioakumuliranih olova i žive 2x veće u ljetnom periodu u odnosu na zimski.



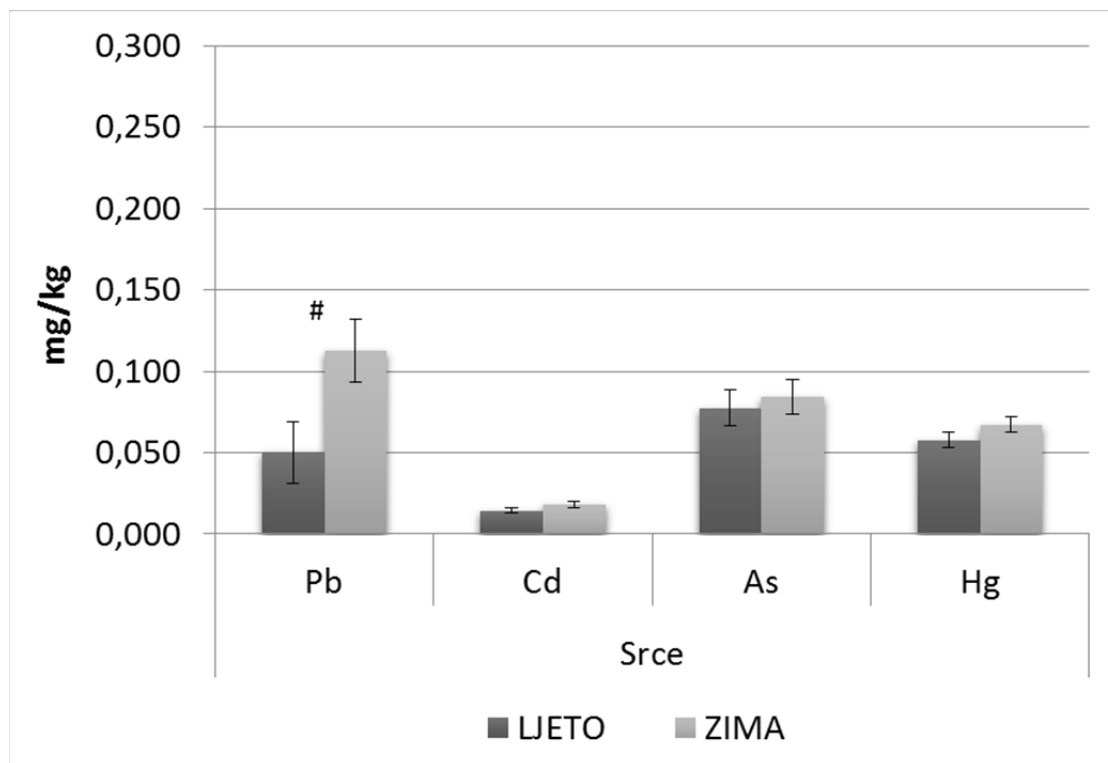
Slika 4. Koncentracije Pb, Cd, As, Hg u škragama u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) u ljetnom (N= 9) i zimskom periodu (N= 9). # Statistički značajno različito ($p \leq 0.05$) između godišnjih doba za svaki pojedini analizirani metal

Slika 4. prikazuje koncentracije teških metala u škragama murina ulovljenih u ljetnom i zimskom periodu. Uočljivo je da je koncentracija arsena najviše bioakumulirana u škragama u odnosu na druge metale. Sljedeći po zastupljenosti su živa i olovo. Kadmij je najmanje bioakumuliran u škragama. Svi metali prisutni su u većoj koncentraciji u ljetnom periodu, izrazito arsen i olovo.



Slika 5. Koncentracije Pb, Cd, As, Hg u jetri u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) u ljetnom (N= 9) i zimskom periodu (N= 9). # Statistički značajno različito ($p \leq 0,05$) između godišnjih doba za svaki pojedini analizirani metal

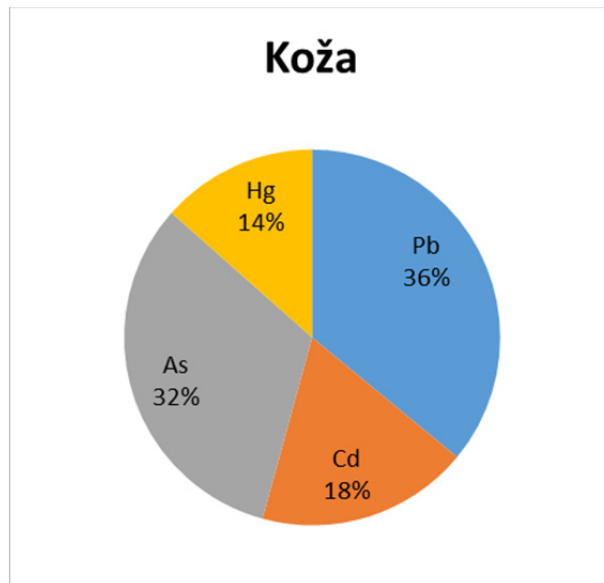
Slika 5. prikazuje koncentracije teških metala u jetri u ribama ulovljenim u ljetnom i zimskom periodu. Najveća je koncentracija bioakumulirane žive u odnosu na druge metale. Živa se različito nakuplja s obzirom na godišnja doba i njena koncentracija u jetri je nešto veća u ljetu nego u zimi. Drugi po koncentraciji nakupljeni metal je kadmij. Značajno je da se kadmij nakuplja u vrlo visokim koncentracijama (sličnim kao i bioakumulirana živa) u zimskom periodu dok je u ljetnom periodu koncentracija kadmija u jetri nešto niža i sličnija je umjereno nakupljenima olovu i arsenu čije koncentracije ne prelaze 0,2 mg/kg tkiva. Za arsen i olovo značajno je da imaju vrlo slične koncentracije koje se ne mijenjaju s obzirom na godišnju sezonu.



Slika 6. Koncentracije Pb, Cd, As, Hg u srcu u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) u ljetnom (N= 9) i zimskom periodu (N= 9). # Statistički značajno različito ($p \leq 0,05$) između godišnjih doba za svaki pojedini analizirani metal

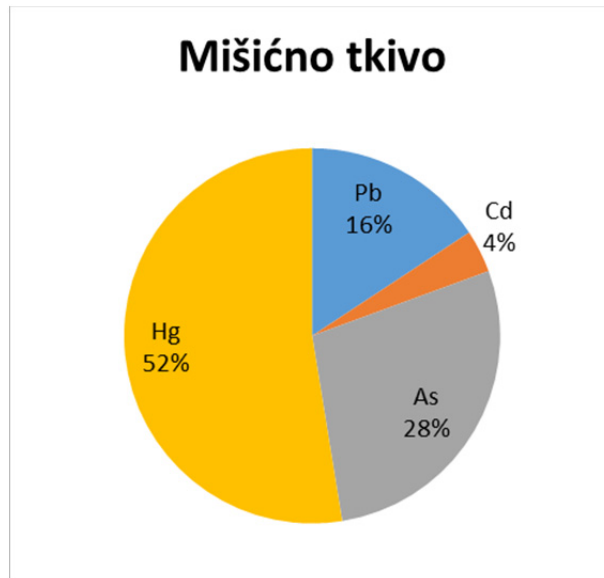
Slika 6. prikazuje koncentracije teških metala u srcu u riba ulovljenih u ljetnom i zimskom periodu. Najveća je koncentracija bioakumuliranog olova u zimskom periodu u odnosu na druge metale. Izmjerene koncentracije bioakumuliranog olova u srcu murine također pokazuju razlike s obzirom na godišnja doba, znatno su veće zimi. Kod ostalih metala ne mjerimo značajne sezonske oscilacije, koncentracije su podjednake u zimskom i ljetnom periodu. Koncentracije bioakumuliranih arsena i žive ne prelaze 0,1 mg/kg tkiva. Dok je koncentracija bioakumuliranog kadmija izrazito mala, ne prelazi 0,05 mg/kg.

4.2. Postotni omjeri ukupnih mjerenja koncentracije metala bioakumuliranih u pojedinim organima



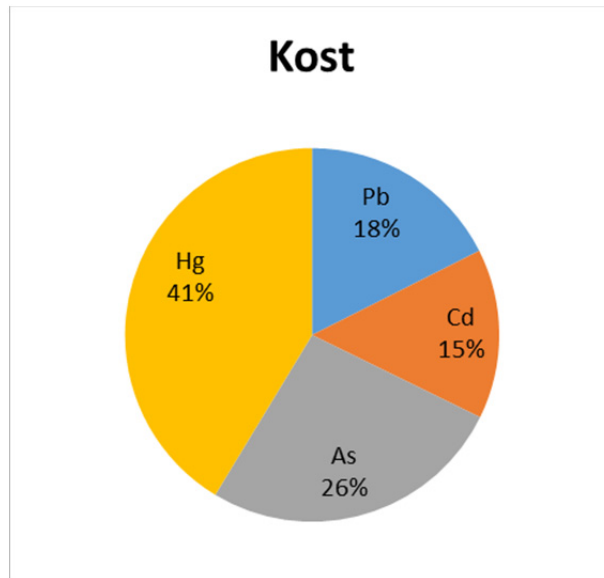
Slika 7. Postotni udio od ukupne količine detektiranih metala Pb, Cd, As, Hg u koži u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki (N= 18).

Slika 7. prikazuje postotni udio od ukupne količine detektiranih teških metala, olova, kadmija, arsena i žive u koži murine u zbirnoj analizi od svih ulovljenih jedinki. Na ovaj način možemo vidjeti da su u koži murine najviše bioakumulira olovo i arsen u odnosu na kadmij i živu, gotovo duplo više. Najmanji postotak bioakumuliranog teškog metala u koži zauzima živa.



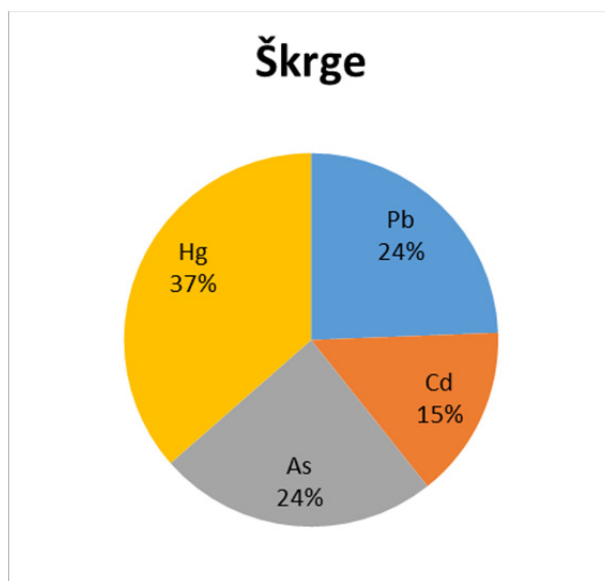
Slika 8. Postotni udio od ukupne količine detektiranih metala Pb, Cd, As, Hg u mišićnom tkivu u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki (N= 18).

Slika 8. prikazuje postotni udio od ukupne količine detektiranih teških metala bioakumuliranih u mišićnom tkivu sveukupno ulovljenih murina u ljetnom i zimskom razdoblju. Od ukupne količine detektiranih teških metala u mišićnom tkivu murina vidljivo je da je živa najzastupljenija, prisutna je sa više od 50 % u postotnom udjelu sveukupnog sadržaja teških metala. Arsen zauzima četvrtinu količine teških metala, olovo u manjem udjelu od arsena. Dok je kadmij bioakumuliranim u neznatnom postotku u odnosu na ostale teške metale.



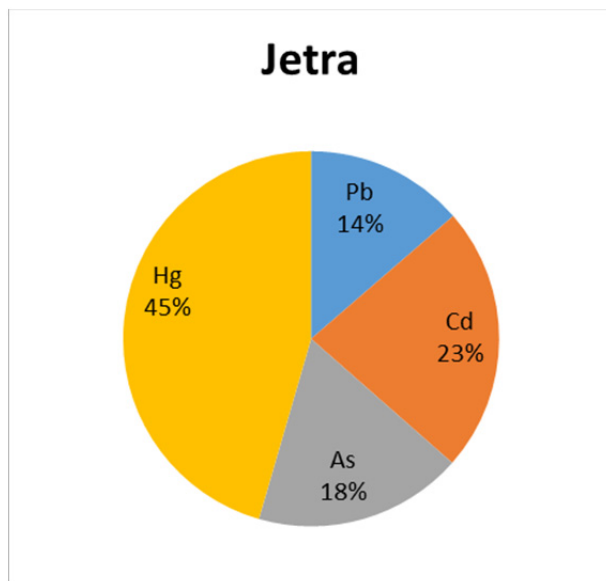
Slika 9. Postotni udio od ukupne količine detektiranih metala Pb, Cd, As, Hg u kostima u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki (N= 18).

Slika 9. prikazuje postotni udio od ukupne količine detektiranih teških metala u kostima murina analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki. Najveći postotak bioakumulacije u kostima murina, unutar ljetnog i zimskog razdoblja, zauzima živa. U odnosu na koncentraciju žive, olovo i kadmij koncentrirani su u dvostruko manjoj količini. Od sveukupne količine koncentriranih teških metala u kostima murine, jedna četvrtina otpada na arsen.



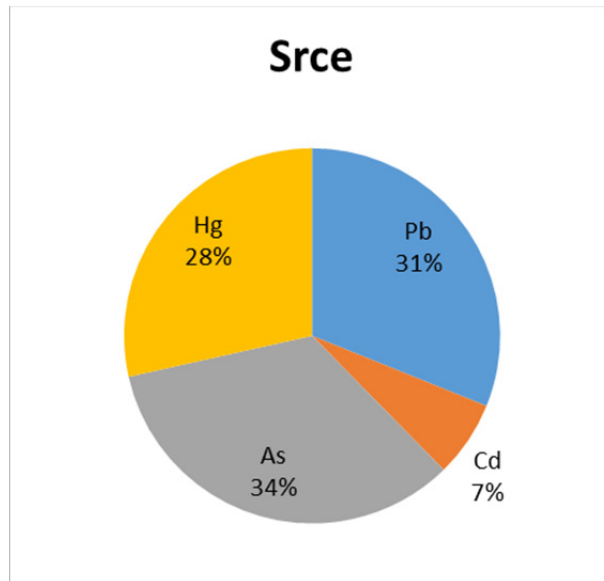
Slika 10. Postotni udio od ukupne količine detektiranih metala Pb, Cd, As, Hg u škrgrama u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki (N= 18).

Slika 10. prikazuje postotni udio od ukupne količine detektiranih teških metala olova, kadmija, arsena i žive u škrgrama murina analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki unutar ljetnog i zimskog razdoblja. Vidljivo je da je živa najzastupljenija, dok su arsen i olovo sljedeći po zastupljenosti, prisutni u jednakom omjeru zauzimaju svaki po četvrtinu sveukupne količine bioakumuliranih teških metala u škrgrama svih ulovljenih jedinki. Kadmij je najmanje zastupljen u škrgrama sa 15 %-tnim udjelom.



Slika 11. Postotni udio od ukupne količine detektiranih metala Pb, Cd, As, Hg u jetri u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki (N= 18).

Slika 11. prikazuje postotni udio od ukupne količine detektiranih metala, olova, kadmija, arsena i žive u jetri murina analiziranih zbirno u ljetnom i zimskom razdoblju. Vidljivo je da je živa najviše bioakumulirana, zauzima najveći udio, gotovo pola sveukupnog udjela teških metala u jetri svih ulovljenih jedinki. Sljedeći po zastupljenosti je kadmij sa četvrtinom u udjelu svih teških metala. Olovo je bioakumulirano u najmanjem udjelu.



Slika 12. Postotni udio od ukupne količine detektiranih metala Pb, Cd, As, Hg u srcu u vrste ribe mediteranske murine (*Muraena helena* L.) analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki (N= 18).

Slika 12. prikazuje postotni udio ukupne količine detektiranih metala olova, kadmija, arsena i žive u srcu murina analiziranih zbirno u svih ulovljenih jedinki u ljetnom i zimskom periodu. Iz prikaza je vidljivo da je arsen najzastupljeniji u srcu. Živa i olovo su bioakumulirani u podjednakom omjeru kao i arsen. Kadmij je neznatno zastupljen, slično kao i u mišićnom tkivu, samo oko 5 %.

5 RASPRAVA

Bioakumulacija teških metala složen je fenomen kojim upravljaju ili fizikalno-kemijska svojstva tih spojeva ili ekološki i biološki čimbenici indikatorskih organizama kao što su trofički položaj, hranidbena ponašanja, stanište, dob, spol, zdravlje kao i lipidni ili proteinski sastav tkiva ili organa životinje (Đikić i sur. 2013b).

Bentički organizmi i bentičke ribe izloženi su sedimentnim ksenobioticima kroz nekoliko puteva, kao izravan kontakt sa sedimentom, respiracijom intersticijske vode i slučajnom ingestijom sedimenta i drugih bentičkih organizama (Rainbow Philip 1984).

U ekotoksikologiji različiti morski organizmi služe kao bioindikatorske vrste za praćenje distribucije i akumulacije ksenobiotika (Rainbow Philip 1984; Yarsan i Yipel 2013). U ekotoksikologiji mora i prometa teških metala kroz morski okoliš, najčešći bioindikatorski sedentarni organizmi za praćenje bioakumulacije teških metala su školjkaši, poglavito dagnja. Primjerice u Jadranu dagnje su česti bioindikatorski organizam, u istraživanju na južnom Jadranu duž Crnogorske obale u jesen 2006. i proljeće 2007. (Joksimović i sur. 2012) vadene su mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) na pet lokaliteta. Izmjerene su srednje vrijednosti bioakumuliranog arsena od 3,7 – 11,2 mg/kg tkiva suhe tvari. U prethodnim studijama, razine arsena mjerene su u mekom tkivu mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) uzorkovane u nezagađenom moru oko grada Šibenika (Most i Luka) i zagađene vode oko grada Splita (Marina, Jugovinil, Vranjic i Stobreč). Pokazale su varijacije u rasponu od 4 do 30 mg/kg tkiva, sa srednjom vrijednosti od 15,2 mg/kg tkiva (Orescanin i sur. 2006). Nema značajnih razlika između istraživanih područja.

U ribama se teški metali najčešće prate u komercijalnim vrstama primjerice tuni ili sardini. Budući da su ove vrste pokretljive i pelagičke, u ekotoksikologiji mora, za lokalno zagađenje potrebno je identificirati pogodne sedentarne vrste riba koje bi bile dobar bioindikatorski organizam za akumulaciju metala vezanih za morsko dno.

Na temelju rezultata prehrambenih navika murine (visoki položaj u trofičkoj piramidi) koje je pokazala Matić-Skoko i sur. (2011), vjerujemo da širok raspon bentičkih organizama koje konzumira murina, kao i višegodišnja starost koju doseže ova vrsta ribe, te njen intramuskularni i potkožni sadržaj masti i bentoski sedentarni način života omogućuju akumuliranje značajnih teških metala u ovoj ribi. U ovom radu ispitali smo potencijal murine

kao bioindikatorskog organizma. Posebno je zanimljivo to što se Jadransko more na mjestima gdje su prikupljene analizirane ribe smatralo relativno nekontaminiranim područjem bilo kojim zagađivačima. U ovom radu prikazani su rezultati analize teških metala s obzirom na godišnja doba odnosno na ljetnu i zimsku sezonu u kojoj su ribe uhvaćene. U radu su obuhvaćene analize pojedinih organa sa ciljem da se uspoređi i bioindikatorski potencijal pojedinih organa, odnosno da li je pojedini organ specifičan za nakupljanje analiziranih metala žive, arsena, olova i kadmija.

Rezultati pokazuju da od svih istraživanih metala, promatramo li sve prikupljene uzorke bez obzira na sezonu, živa je najzastupljeniji akumulirani metal u svim organima osim srca i kože. Koža najviše nakuplja olovo.

Naši rezultati poklapaju se sa sličnim nalazima za ribe u Jadranu u istraživanju, (Vukadin i sur. 1995) koje obuhvaća tri vrste ribe: trlja blatarica (*Mullus barbatus*), oslić (*Merluccius merluccius*) i arbun (*Pagellus erythrinus*) ulovljene blizu većeg gradskog naselja, u Kaštelanskom zaljevu kod Splita, i na otvorenom moru kod otoka Visa, pokazalo se da je koncentracija žive kod arbuna ulovljenog na otvorenom moru veća (1,30 mg/kg mokre težine) što se objašnjava dijelom time što je u južnom Jadranu koncentracija žive prirodno veća (autori navode da je to prirodni fenomen), a dijelom što je arbun pridnena vrsta i hrani se uglavnom bentičkim organizmima. Pretpostavljamo da su oba navedena pojašnjenja koje navode autori za arbuna slično primjenjivi i za murinu iako naše izmjerene koncentracije žive nisu bile toliko visoke kao kod arbuna.

Arsen je drugi po zastupljenosti metal prisutan u većini organa osim jetre i škrge (u škragama je olovo jednako zastupljeno po postotnom udjelu). Primjerice, Jureša i Blanuša (2003) proveli su istraživanje prisutnosti teških metala u mesu ribe i školjkaša koje su skupili na Zagrebačkoj tržnici, a svi primjerci su ulovljeni na poznatim lokacijama. Najveća vrijednost za arsen izmjerena kod oslića (*Merluccius merluccius*) ulovljenog kod Murtera iznosi $23,30 \pm 3,56$ mg/kg mokre težine, srednja vrijednost od $n=3$. Nadalje, Bilandžić i sur. su (2011) mjerili koncentraciju arsena u mišićnom tkivu kod četiri vrste riba s tržnica duž hrvatske jadranske obale, incun (*Engraulis encrasicolus*), lokarda (*Scomber japonicus*), trlja kamenjarka (*Mullus surmuletus*) i gira oblica (*Spicara smaris*). Izmjerene vrijednosti kod incuna bile su rasponu 0,01 mg/kg tkiva – 54,8 mg/kg tkiva sa srednjom vrijednosti 0,43 mg/kg tkiva. Kod lokarde u rasponu od 0,01 mg/kg tkiva – 36,4 mg/kg tkiva sa srednjom vrijednosti 0,53 mg/kg tkiva. Kod trlje u rasponu 0,01 mg/kg tkiva – 70,9 mg/kg tkiva sa

srednjom vrijednosti 5,91 mg/kg tkiva. Kod gire oblice 0,01 mg/kg tkiva – 54,6 mg/kg tkiva sa srednjom vrijednosti 0,72 mg/kg tkiva. Naše izmjerene razine arsena u mišićnom tkivu bile su oko 0,03 mg/kg u ljetnom periodu i 0,13 mg/kg u zimskom periodu. Vrijednosti u ovim radovima su znatno veće u odnosu na naše izmjerene vrijednosti.

Iako je, kod našeg istraživanja, olovo treće po zastupljenosti u svim organima (osim škrge), postotni udio koncentracije u odnosu na druge metale nije zanemariv i relativno je visok. Primjerice, izmjerene koncentracije olova bioakumuliranog u mišićnom tkivu iznose oko 0,05 mg/kg. Drugi autori, npr. Bilandžić i sur. su (2011) mjerili koncentraciju olova u mišićnom tkivu kod četiri vrste riba s tržnica duž hrvatske jadranske obale, inćun (*Engraulis encrasicolus*), lokarda (*Scomber japonicus*), trlja (*Mullus surmuletus*) i gira oblica (*Spicara smaris*). I navode da su koncentracije olova u prosjeku oko 0,01-0,02 mg/kg tkiva, što je relativno blisko našim rezultatima.

S obzirom na organe, u našem istraživanju najveće dosegnute prosječne koncentracije za živu iznose oko 0,5 mg/kg u tkivu jetre i oko 0,25 mg/kg u kostima, za arsen oko 0,2 mg/kg u škragama, za olovo oko 0,175 mg/kg u kostima a za kadmij 0,25 mg/kg u koži.

Nema mnogo radova koji uspoređuju bioakumulaciju teških metala u različitim tkivima riba u Jadranu, ali su na primjer Šuran i sur. (2015) objavili članak o prisutnosti bioakumuliranih kadmija i olova u različitim tkivima, mišićno tkivo, bubrezi i jetra, dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) i prugastog dupina (*Stenella coeruleoalba*), nasukanih između 1990. i 1999. na Hrvatskoj obali Jadranskog mora. Kadmij u jetri bio je bioakumuliran 0,406 µg/g tkiva, u mišićnom tkivu 0,165 µg/g tkiva. Olovo bioakumulirano u jetri 0,34 µg/g tkiva, olovo bioakumulirano u mišićnom tkivu 0,12 µg/g tkiva. Izražene vrijednosti su srednje vrijednosti (od n=17) mokre težine.

Naša mjerenja pokazuju razinu bioakumuliranog olova u mišićnom tkivu do 0,06 mg/kg tkiva, a u jetri do 0,2 mg/kg tkiva. Razina bioakumuliranog kadmija u jetri mjerena je prosječno 0,3 mg/kg tkiva, dok je u mišićnom tkivu nije prelazila 0,02 mg/kg. Primjećujemo da su izmjerene koncentracije kadmija i olova kod dupina znatno veće od naših izmjerenih vrijednosti što se može objasniti time da dupin živi razmjerno duže nego murina.

U ovom istraživanju smo, u većini organa, osim srca, izmjerili najveću bioakumulaciju tijekom ljetnog perioda. Za usporedbu, Brkić i sur. (2017) proveli su istraživanje bioakumuliranih teških metala u različitim vrstama ribe, sakupljenim na tržnicama diljem Hrvatske, tijekom proljeća i ljeta 2012. i 2013. godine. Izmjerene koncentracije olova ne

prelaze 0,05 mg/kg tkiva, izuzev u jesen 2012. kod srdele je izmjereno 0,09 mg/kg tkiva, što je ujedno i najveća izmjerena veličina za olovo. Izmjerene razine koncentracije bioakumuliranog kadmija u proljeće ne prelaze 0,01 mg/kg, dok u jesen tek poneke prelaze, npr. papalina prikupljena u jesen 2012. kod koje je izmjereno 0,024 mg/kg. Neznatno, ali zamjetno koncentracije mjerene u jesen veće su od koncentracija mjerenih u proljeće. Slično kao kod naših mjerenja gdje primjećujemo veću bioakumulaciju u ljetnom periodu.

Jedan od recentnijih radova na Jadranu (Fočak i sur. 2019) istražuje prisutnost teških metala u celomskoj tekućini morskog ježinca (*Arbacia lixula*), provedenog u Hvarskom kanalu (43°27', 17°03'; blizina Makarske) tijekom kolovoza 2016. Izmjerene su srednje vrijednosti 0,644 ppm bioakumuliranog olova i 0,031 ppm bioakumuliranog kadmija. (Bille i sur. 2015) istražuju koncentracije bioakumuliranog olova u školjkašima u Venecijskoj laguni, primjerice srčanka (*Cerastoderma edule*) 0,21 mg/kg mokre težine.

6 ZAKLJUČCI

U većini organa, osim srca, teški metali se više bioakumuliraju tijekom ljetnog perioda.

Iznimno u zimskom periodu živa i arsen akumuliraju se najviše samo u mišićnom tkivu.

Od svih istraživanih metala, promatramo li sve prikupljene uzorke bez obzira na sezonu, živa je najzastupljeniji akumulirani metal u svim organima osim srca i kože. Koža najviše nakuplja olovo.

Arsen je drugi po zastupljenosti metal prisutan u većini organa osim jetre i škrगा (u škrगama je olovo jednako zastupljeno po postotnom udjelu).

Iako je olovo treće po zastupljenosti u svim organima (osim škrगा), postotni udio koncentracije u odnosu na druge metale nije zanemariv i relativno je visok.

Najveće dosegnute prosječne koncentracije iznose za živu oko 0,5 mg/kg u tkivu jetre i oko 0,25 mg/kg u kostima, za arsen oko 0,2 mg/kg u škrгama, za olovo oko 0,175 mg/kg u kostima, a za kadmij 0,25 mg/kg u koži.

Olovo i kadmij se u većini organa (iznimka su kosti za olovo i koža za kadmij) nalaze u koncentracijama ispod 0,1 mg/kg tkiva.

Također je zamjetno da se arsen više akumulira u zimskom periodu, osim u škrгama i jetri.

7 LITERATURA

ATSDR (2012): Toxicological Profile for Cadmium. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.

Berntssen M.H.G., Aspholm O., Hylland K., Wendelaar Bonga S., Lundebye A. (2001): Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. *Comparative biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **128** (3): 299-310.

Bilandžić N., Đokić M., Sedak M. (2011): Metal content determination in four fish species from the Adriatic Sea. *Food Chemistry* **124** (3): 1005-1010.

Bille L., Binato G., Capa V., Toson M., Dalla Pozza M., Arcangeli G., Ricci A., Angeletti R., Piro R. (2015): Lead, mercury and cadmium levels in edible marine molluscs and echinoderms from the Veneto Region (north-western Adriatic Sea – Italy). *Food Control* **50**: 362-370.

Blanuša M., Telišman S., Hršak J., Fugaš M., Prpić-Majić D., Šarić M. (1991): Assessment of exposure to lead and cadmium through air and food in inhabitants of Zagreb. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **42**: 257-266.

Borak J., Hosgood H.D. (2007): Seafood arsenic: Implications for human risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **47**: 204-212.

Brkić D., Bošnjir J., Gross Bošković A., Miloš S., Šabarić J., Lasić D., Jurak G., Cvetković B., Racz A., Mojsović Čuić A. (2017): Determination of heavy metals in different fish species sampled from markets in Croatia and possible health effects. *Med.Jad.* **47** (3-4): 89-105.

Burger J. (2008): Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci. Total Environ.* **389**: 37-45.

Bustamante P., Caurant F., Fowler S.W., Miramand P. (1998): Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Sci. Total Environ.* **220**: 71-80.

Caurant F., Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Sauriau P.G. (1994) Ecological and biological factors controlling the concentrations of trace elements (As, Cd, Cu, Hg, Se, Zn) in delphinids *Globicephala melas* from the north Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog.* **103**: 207-219.

Croteau M., Luoma S.N., Stewart A.R. (2005): Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.* **50** (5): 1511–1519.

Dietz R., Riget F., Johansen P. (1996): Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals. *Science of the Total Environment* **186**: 67-93.

Duraković Z., Labar B. (2000): Hematološke promjene kao posljedice otrovanja. U: *Klinička toksikologija*, Grafos, Zagreb, str. 83-87.

Đikić D., Landeka I., Fuchs R., Skaramuca D., Matić-Skoko S., Tutman P., Franić Z., Cvetković I., Skaramuca B. (2017): Lipid profiles of Mediterranean moray, *Muraena helena*, European conger, *Conger conger*, and European eel, *Anguilla anguilla* (Actinopterygii: Anguilliformes). *Acta Ichthyol. Piscat.* **47** (1): 1–11.

Đikić D., Lisičić D., Matić-Skoko S., Tutman P., Skaramuca D., Franić Z., Skaramuca B. (2013a): Comparative hematology of wild Anguilliformes (*Muraena helena*, L. 1758, *Conger conger*, L. 1758 and *Anguilla anguilla* L. 1758). *Animal Biology* **63** (1): 77–92.

Đikić D., Mojsović Čuić A., Jurak G., Lasić D., Skaramuca D., Matić-Skoko S., Tutman P., Bošnjir J., Franjević D., Franić Z., Fuchs R., Skaramuca B. (2013b): Organochlorine pesticides in *Muraena helena* L. 1758 from the eastern Adriatic Sea. *Journal of Applied Ichthyology* **30** (3): 496-501.

EFSA, European Food Safety Agency (2012): Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* **10** (3): 2579.

EFSA, European Food Safety Agency (2010): Scientific Opinion on Lead in Food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal* **8** (4): 1570.

Eisler R. (2009): *Compendium of Trace Metals and Marine Biota Volume 2: Vertebrates*. Elsevier, Amsterdam.

Emsley J. (2011): *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. Oxford University Press, Oxford

European Commission, Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*, 2006, L 364/5

Filipović L. (2015) Modifikacija biopristupačnosti bakra i kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari i saliniteta tla [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet; 2015.

Fočak M., Džafić S., Suljević D. (2019): Electrolytes and Heavy Metals in Coelomic Fluid of Sea Urchin, *Arabacia lixula* from Adriatic Sea: Biochemical Approach to Ecotoxicological Study. *Naše more* **66** (2): 51-56

Gibbs P.E., Langston W.J., Burt G.R., Pascoe P.L. (1983): *Tharyx marioni* (Polychaeta): a remarkable accumulator of arsenic. *J. Mar. Biol. Assoc. U K* **63**: 313–325.

Gray T. (2012): *Arsenic*. U: Gray, T., Mann, N. (ur.). *Elements: A Visual Exploration of Every Known Atom in the Universe*. Hachette Books. ISBN 978-1579128951.

HAH (2014): Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske. Hrvatska agencija za hranu HAH–Z–2014-2

Izvješće o stanju okoliša u Republici Hrvatskoj, 2014. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb

- Joksimović D., Kljajić Z., Stanković S. (2012): Concentrations of Heavy Metals (Zn, Cu, Pb, Cd and As) in the Mediterraneanan Mussel *Mytilus galloprovincialis* from the montenegrin Coast of the Southeast Adriatic Sea. *Water Research and Management* **2** (3): 3-9.
- Jureša D. i Blanuša M. (2003): Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Additives and Contaminants* **20** (3): 241-246.
- Kraal M.H., Kraak M.H.S., De Groot C.J., Davids C. (1995): Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **31**: 179-183.
- Kubota R., Kunito T., Tanabe S. (2002) Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals. *Mar. Pollut. Bull.* **45**: 218-223.
- Kuenen Jeroen i sur. (2018): Mercury in Europe's Environment. European Environment Agency. EEA Report **11**
- Lavoie R.A., Jardine T.D., Chumchal M.M., Kidd K.A., Campbell L.M. (2013): Biomagnification of Mercury in Aquatic Food Webs: A Worldwide Meta-Analysis. *Environmental Science & Technology* **47** (23): 13385–13394.
- Lazarus M. (2010): Cadmium and selenium interaction in mammals. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **61**: 357-369.
- Marnane I. (2018): Mercury: a persistent threat to the environment and people's health. European Environment Agency Newsletter 2018/3
- Matić-Skoko S., Tutman P., Bojanić Varezić D., Skaramuca D., Đikić D., Lisičić D., Skaramuca B. (2014): Food preferences of the Mediterranean moray eel, *Muraena helena* (Pisces: Muraenidae), in the southern Adriatic Sea. *Marine Biology Research* **10** (8): 807-815.
- Matić-Skoko S., Tutman P., Petrić M., Skaramuca D., Đikić D., Lisičić D., Skaramuca B. (2011): Mediterranean moray eel *Muraena helena* (Pisces: Muraenidae): biological indices for life history. *Aquatic Biology* **13**: 275-284.
- McKelvey W., Jeffery N., Clark N., Kass D., Parsons P.J. 2010 (2011): Population-Based Inorganic Mercury Biomonitoring and the Identification of Skin Care Products as a Source of Exposure in New York City. *Environmental Health Perspectives* **119** (2): 203–9.
- Nachman K.E., Graham J.P., Price L.B., Silbergeld E.K. (2005). Arsenic: A Roadblock to Potential Animal Waste Management Solutions. *Environmental Health Perspectives* **113** (9): 1123–1124.
- Orescanin V., Lovrencic I., Mikelic L., Barisic D., Matasin Z., Lulic S., et al. (2006): Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the Middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* **245**: 495–500.
- Peryea F. J. (1998): Historical use of lead arsenate insecticides, resulting in soil contamination and implications for soil remediation. 16th World Congress of Soil Science. Montpellier, France.

Rainbow Philip S. (1984): The biology of heavy metals in the sea. London: School of Biological Sciences, Queen Mary College; 1984

Sapunar-Postružnik J., Bažulić D., Kubala H., Balint L. (1996): Estimation of dietary intake of lead and cadmium in the general population of the Republic of Croatia. *Science of the Total Environment* **177**: 31-35.

SCOOP, Scientific Cooperation (2004): SCOOP Report of experts participating in Task 3.2.11. March 2004. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. Dostupno na: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-21_heavy_metals_report_en.pdf. pp. 125

Somero G.N., Chow T.J., Yancey P.H., Synder C.B. (1977): Lead accumulation rates in tissues of the estuarine teleost fish, *Gillichthys mirabilis*: salinity and temperature effects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **6**: 337-348.

Šuran J., Đuras M., Gomerčić T., Bilandžić N., Prevendar Crnić A. (2015): Cadmium and lead concentrations in the tissues of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded on the Croatian Adriatic coast. *Veterinarski arhiv* **85** (6): 677-688

Tukker A., Buijst H., van Oers L., van der Voet E. (2001): Risks to health and the environment related to the use of lead in products. TNO Report STB-01-39.

Vukadin I., Zvonarić T., Odžak N. (1995): Fate and distribution of toxic heavy metals in some marine organisms from the eastern Adriatic coast. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **49**: 679-688.

WHO/IPCS, World Health Organization/International Programme on Chemical Safety (1989): Lead - environmental aspects. *Environmental Health Criteria* **85**.

Winder C. (1993): The history of lead — Part 3. *LEAD Action News* **2** (3)

Yarsan E., Yipel M. (2013): The important terms of marine pollution "Biomarkers and biomonitoring, bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification", *J Mol Biomark Diagn* 2013.

Zakon o kontaminantima (2013): *Narodne novine* **NN 39/2013**.

