

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

IVANA GRGIĆ I ZUZANA REDŽOVIĆ

**Procjena antropogenih utjecaja na rijeku Krku i
potencijalne opasnosti za Nacionalni park Krka**

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Jasne Lajtner s Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu i dr. sc. Vlatke Filipović Marijić s Instituta Ruđer Bošković i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS KRATICA

BAM	eng. <i>Bioaccumulation Monitoring</i> , bioakumulacijski monitoring
BEM	eng. <i>Biological Effects Monitoring</i> , biološki monitoring
BHT	butilirani hidroksitoluen
BSA	eng. <i>bovine serum albumin</i>
CFU	eng. <i>colony-forming unit</i>
CM	eng. <i>Chemical Monitoring</i> , kemijski monitoring
°dH	njem. <i>Deutsche Härte</i> , njemački stupnjevi tvrdoće vode
DDT	diklordifeniltrikloretan
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EM	eng. <i>Environmental Monitoring</i> , monitoring ekosustava
FAU	eng. <i>formazine attenuation units</i>
HM	eng. <i>Health Monitoring</i> , zdravstveni monitoring
HR ICP-MS	eng. <i>High Resolution Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> , maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom
GSH	reducirani glutation
KEC	koliformi: <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> i <i>Citrobacter</i>
KPK	kemijska potrošnja kisika
KT	karbonatna tvrdoća vode
LEU	leupeptin
MDA	malondialdehid
MPN	eng. <i>most probable number method</i> , metoda najvjerojatnijeg broja
MS-222	metan-sulfonat-metaamino-etilester benzojeva kiselina, anestetik
MT	metalotionein
ORP	oksidoredukcijski potencijal
PMSF	fenil-metilsulfonil-fluorid
ROS	eng. <i>Reactive Oxygen Species</i> , kisikove reaktivne vrste
TBA	tiobarbituratna kiselina
TCA	trikloroctena kiselina
TDS	eng. <i>total dissolved solids</i> , ukupno otopljene soli
TEP	1,1,3,3-tetraetoksi-propan
UT	ukupna tvrdoća vode

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Riječni ekosustavi	1
1.2.	Procjena kakvoće voda	1
1.3.	Metali u riječnim ekosustavima	2
1.4.	Metali u vodenim organizmima	3
1.5.	Biomonitoring	4
1.6.	Biomarkeri	5
	1.6.1. Metalotioneini	6
	1.6.2. Malondialdehid	7
	1.6.3. Ukupni citosolski proteini	9
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	10
3.	MATERIJALI I METODE	12
3.1.	Područje istraživanja – rijeka Krka	12
3.2.	Uzorkovanje	13
3.3.	Indikatorski organizam – potočna pastrva	15
3.4.	Određivanje biometrijskih parametara riba	16
3.5.	Mjerenje fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode	17
3.6.	Mjerenje mikrobioloških čimbenika kakvoće vode	18
3.7.	Određivanje koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi	18
3.8.	Obrada tkiva jetre u svrhu određivanja koncentracije citosolskih metala i staničnih biomarkera	20
3.9.	Određivanje koncentracije metala u staničnom citosolu jetre potočne pastrve	20
3.10.	Određivanje staničnih biomarkera	21
	3.10.1. Određivanje koncentracije metalotioneina	21
	3.10.2. Određivanje koncentracije malondialdehida	22
	3.10.3. Određivanje koncentracije ukupnih citosolskih proteina	23
3.11.	Statistička obrada podataka	24
4.	REZULTATI	25
4.1.	Fizikalno-kemijski čimbenici kakvoće vode	25
4.2.	Mikrobiološka kakvoća vode rijeke Krke	27
4.3.	Koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke	28
4.4.	Biomarkerski pokazatelji jedinki potočne pastrve	30
4.5.	Koncentracija metala u citosolu jetre potočne pastrve	31

SADRŽAJ

4.6.	Biomarkeri	33
4.6.1.	Koncentracije metalotioneina	33
4.6.2.	Koncentracije malondialdehida	33
4.6.3.	Koncentracije ukupnih citosolskih proteina	34
5.	RASPRAVA	35
5.1.	Procjena kakvoće vode s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike	35
5.1.1.	Temperatura vode	35
5.1.2.	Zamućenje vode	36
5.1.3.	pH i oksido-redukcijski potencijal	36
5.1.4.	Alkalitet	37
5.1.5.	Ukupno otopljene soli i vodljivost	37
5.1.6.	Otopljeni ugljični dioksid, karbonatna i ukupna tvrdoća vode	38
5.1.7.	Režim kisika	38
5.1.8.	Hranjive tvari	39
5.2.	Procjena kakvoće vode s obzirom na mikrobiološke čimbenike	40
5.3.	Koncentracije ukupno otopljenih metala	41
5.4.	Biološke promjene u potočnoj pastrvi	43
5.4.1.	Koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve	44
5.4.2.	Biomarkeri	45
5.4.2.1.	Metalotionein	45
5.4.2.2.	Malondialdehid	45
5.4.2.3.	Ukupni citosolski proteini	46
6.	ZAKLJUČCI	48
7.	ZAHVALE	49
8.	LITERATURA	50
9.	SAŽETAK	59
10.	SUMMARY	60
11.	ŽIVOTOPIS	61

1.1. Riječni ekosustavi

Voda je u cjelokupnoj povijesti civilizacije smatrana za dragocjeno, za ljude nezamjenjivo dobro i zato je danas jedan od prioriteta čovječanstva očuvanje kakvoće voda. Slatkovodni ekosustavi čine samo 0,01 % ukupne vode i oko 0,8 % površine Zemlje, ali taj mali postotak nije zanemariv već je od velike važnosti za biološku raznolikost, ekonomske, kulturne i estetske vrijednosti (Dudgeon i sur., 2006). Zbog svoje izoliranosti i ograničene količine slatkovodni ekosustavi svrstavaju se među najraznolikije, ali ujedno i najosjetljivije ekosustave na svijetu.

U novije vrijeme zbog industrijskog i tehnološkog napretka dolazi do sve većih promjena prirodnih karakteristika slatkovodnih staništa unošenjem raznih onečišćujućih tvari (Pilić i sur., 2012). U prirodnim vodama onečišćenje potječe iz raspršenih ili točkastih izvora (komunalne, industrijske i poljoprivredne otpadne vode). Često se otpadne vode direktno otpuštaju u rijeke, koje su glavni izvori pitke vode te važan izvor hrane (ribe) pa posebnu pažnju treba obratiti praćenju kakvoće voda riječnih ekosustava (Förstner i Wittmann, 1979).

1.2. Procjena kakvoće voda

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

U svrhu procjene kakvoće voda, donesena je Uredba o standardu kakvoće voda (NN 89/2010) u kojoj su definirani čimbenici za procjenu ekološkog stanja voda. Voda se svrstava u kategorije koristeći dopuštene granične vrijednosti dviju skupina pokazatelja: a) ocjene opće ekološke funkcije voda: fizikalno-kemijski parametri vode (pH, alkalitet, električna vodljivost), režim kisika (otopljeni kisik, zasićenje kisikom, kemijska i biološka potrošnja kisika), hranjive soli (amonij, nitriti, nitrati, ukupni dušik, ukupni fosfor), mikrobiološki (broj koliformnih bakterija, broj fekalnih koliforma, broj aerobnih bakterija) i biološki pokazatelji (fitoplankton, makrofiti, fitobentos); b) pokazatelja koji se ispituju temeljem posebnih programa sadržanih u planovima za zaštitu voda i ciljanim programima

1. UVOD

ispitivanja kakvoće voda: metali (arsen (As), bakar (Cu), cink (Zn), krom (Cr)), organski spojevi (mineralna ulja, fenoli, lindan, DDT) i radioaktivnost.

Na osnovu navedenih pokazatelja kvaliteta vode se svrstava u 5 kategorija: I. kategorija označava vode koje se mogu koristiti za piće jer su zadržane u svom prirodnom stanju, vode II. kategorije su malo onečišćene organskim i anorganskim hranjivim tvarima te su smanjene prozirnosti (npr. vode stajačice), ali se mogu koristiti za sport i rekreaciju. Vode III. kategorije pokazuju značajnije zagađenje organskim i anorganskim hranjivim tvarima te se uglavnom podvrgavaju pročišćavanju kako bi se koristile u određene namjene. Vode IV. kategorije su eutrofne vode koje primaju velike koncentracije organske i anorganske hranjive tvari, s vrlo malom prozirnošću. Razgradnja organskih tvari često dovodi do hipoksije koja uzrokuje pomor biljnih i životinjskih vrsta. Vode V. kategorije su jako onečišćene te u njima dominiraju razgrađivači pa je stoga koncentracija kisika konstantno vrlo niska.

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

1.3. Metali u riječnim ekosustavima

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

1. UVOD

2005). Štetni utjecaj čovjeka na okoliš u znatnoj je mjeri povećan uslijed industrijalizacije i uporabe metala u raznim granama suvremene proizvodnje što ima za posljedicu svakodnevno izlaganje teškim metalima te poremećaj biogeokemijskog ciklusa metala (Scoullou i sur., 2005).

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

1.4. Metali u vodenim organizmima

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

Metali za koje do sada nije otkrivena uloga u metaboličkim procesima nazivamo toksičnim ili neesencijalnim. Toksični metali se zbog svoje kemijske sličnosti s esencijalnim metalima unose u organizam gdje mogu zamijeniti esencijalne metale vezanjem na funkcionalne skupine ili ionskom zamjenom u biološki važnim molekulama

1. UVOD

čime se mijenja aktivna konformacija molekula i dolazi do metaboličkih poremećaja, što posljedično dovodi do toksičnih učinaka, a ovisno o koncentraciji metala i do smrti organizma. U skupinu toksičnih metala ubrajaju se aluminij (Al), arsen (As), kadmij (Cd), olovo (Pb), srebro (Ag), stroncij (Sr), uran (U), živu (Hg) (Wood i sur., 2012b).

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

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

1.5. Biomonitoring

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

1. UVOD

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

Ribe predstavljaju vrijednu prehrambenu namirnicu bogatu kvalitetnim bjelančevinama, mineralima, vitaminima, esencijalnim nezasićenim masnim kiselinama koje imaju pozitivne učinke na zdravlje ljudi te stoga zauzimaju važno mjesto u ljudskoj prehrani. Ribe imaju sposobnost nakupljanja metala, a nalaze se i na vrhu hranidbenog lanca vodenih ekosustava te su često korišteni bioindikatorski organizmi, koji uz procjenu kakvoće vode omogućavaju i procjenu razine rizika za zdravlje ljudi (Srebočan i sur., 2014).

1.6. Biomarkeri

U svrhu što ranijeg otkrivanja utjecaja onečišćenja na organizme, u procjeni biološkog učinka se u biomonitoring studijama koriste biomarkeri. To je zajednički naziv za promjene staničnih struktura ili funkcija koje nastaju nakon izlaganja organizama toksičnim tvarima iz okoliša. Kada štetne tvari dospiju do mjesta toksičnog djelovanja izazivaju mjerljivi i specifični učinak, poput oštećenja te pobudne sinteze ili inhibicije biološki važnih molekula, stoga imaju velik toksikološki značaj (Erk i sur., 2002). Osim na staničnoj, biokemijski utjecaj zagađivala može imati posljedice i na višim organizacijskim

1. UVOD

razinama, poput promjena na razini populacije ili ekosustava. Međutim, brzina pojave promjena uzrokovanih unosom zagađivala u sustav varira s obzirom na razinu biološke organizacije. Poremećaji na razini populacije su manje specifični i daju odgovor tek nakon dugotrajne izloženosti, kada je toksičnim učinkom zahvaćena već cijela populacija. Za razliku od njih, promjene na razini stanice su brzo uočljive te se biomarkeri koriste kao rani pokazatelji onečišćenja (Filipović Marijić, 2004).

Postoje dvije skupine biomarkera, oni koji daju biokemijski odgovor na specifična zagađivala (indukcija niskomolekulskih citosolskih proteina metalotioneina ukazuje na izloženost metalima) te oni čiji molekularni i stanični odgovori ukazuju na općeniti subletalni stres (promjene u peroksidaciji lipida). Idealan biomarker u ekotoksikološkim istraživanjima ne pokazuje sezonsku varijabilnost kao odgovor na dostupnost hrane i reproduktivni status, nego varira samo zbog onečišćenja, ali u praksi je ovo rijedak slučaj (Sheehan i Power, 1999). Glavna poteškoća pri korištenju biomarkera u biomonitoringu je njihova interferencija s okolišnim čimbenicima i zagađenjem. Biomarkeri koji se koriste moraju biti u mogućnosti razlikovati utjecaj okolišnih čimbenika od antropogenog onečišćenja (Hamer i sur., 2008). Zato je potrebno odrediti bazalne koncentracije biomarkera u istraživanom organizmu kako bi se stres uzrokovan onečišćenjem mogao razlikovati od prirodne varijabilnosti biomarkera te kako bi se ispravno interpretirali rezultati (Ivanković i sur., 2003).

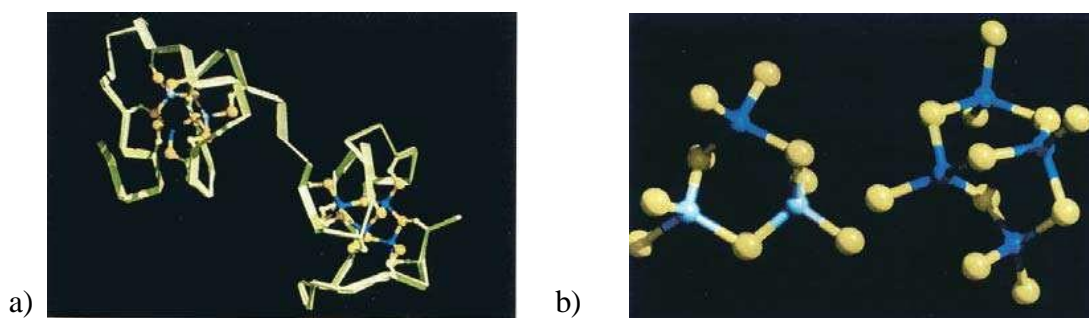
1.6.1. Metalotioneini

Metalotioneini (MT) su niskomolekularni, termostabilni proteini koji su sveprisutni kod prokariota i eukariota te su identificirani u mnogim tkivima beskralješnjaka i kralješnjaka (Hamza-Chaffai i sur., 2000). Struktura im je ostala konzervirana tijekom evolucije, a karakterizira je specifičan aminokiselinski sastav s oko 30 % cisteina te nedostatak aromatskih aminokiselina i histidina. Zahvaljujući tiolnim skupinama (-SH) na cisteinskim ostacima MT imaju visok afinitet za vezanje kationa poput Ag, Cd, Cu, Hg i Zn (Marie i sur., 2006).

Primarna funkcija MT je održavanje homeostaze esencijalnih (Zn i Cu) i detoksifikacija neesencijalnih metala (Cd, Hg i Ag) (Viarengo i Nott, 1993). Povećanjem koncentracije metala u tkivima dolazi do njihovog vezanja na MT što potiče indukciju MT (Amiard i sur., 2006) te se upravo ovaj biokemijski odgovor koristi kao specifični

1. UVOD

biomarker izloženosti metalima (Lecoeur i sur., 2004). Po molekuli MT postoji sedam veznih mjesta u proteinu za dvovalentne metale (Zn^{2+} , Cd^{2+}) koji su tetraedarski koordinirani unutar dvije izolirane metalotioneinske domene: karboksi-terminalna α - domena sa stehiometrijom M4S11 (*cluster* s 4 atoma metala) te amino-terminalna β - domena sa stehiometrijom M3S9 (*cluster* s 3 atoma metala) (Slika 1). Ukoliko su ioni metala jednovalentni, poput Cu^+ i Ag^+ , struktura može biti digonalna ili trigonalna, a čine je i dalje 2 *cluster*a, no uz razliku što svaki sadrži 6 iona (Vašak i sur., 1980).



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

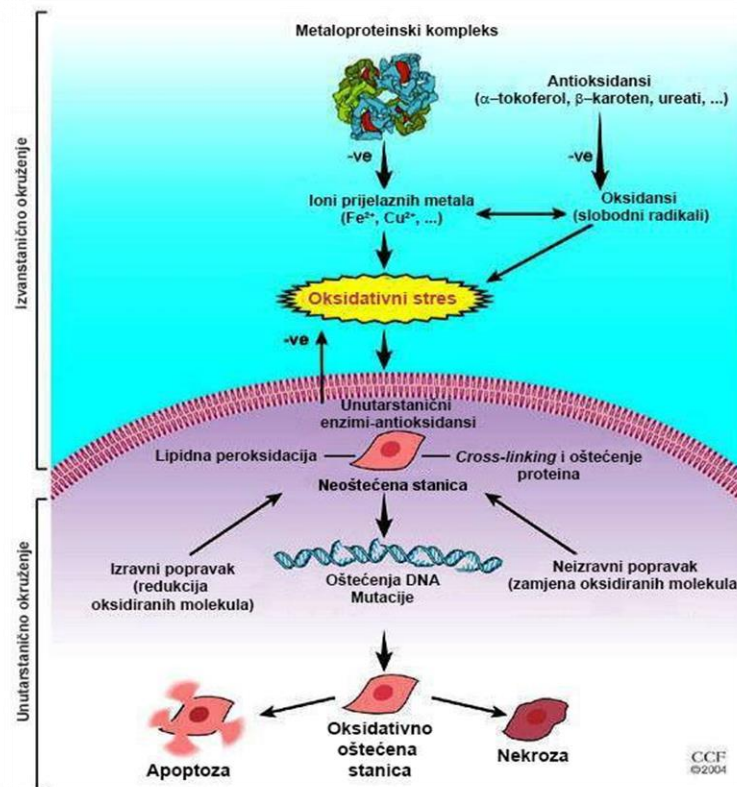
Pobudni odgovor MT u riba ovisi o vrsti, starosti, spolu, fiziološkom stanju organizma, pH vrijednosti, temperaturi, salinitetu, sezoni, a ne samo o koncentraciji biološki dostupnih metala u vodi. Također, hormoni, reproduktivni stadij i nutritivni status utječu na vezanje metala na MT ili potiču njegovu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

1.6.2. Malondialdehid

Lipidna peroksidacija je jedan od najistraživanijih procesa ozljede tkiva nastalih zbog slobodnih radikala. Predstavlja složeni niz lančanih reakcija (Slika 2), koji uključuje oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina (Valavanidis i sur., 2006). Stanice kontinuirano proizvode slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve u okviru svojih metaboličkih procesa. Slobodni radikali se definiraju kao bilo koji atom, molekula ili ion s nesparenim elektronom (Halliwell i Gutteridge, 1984). Biološki su najznačajnije kisikove reaktivne vrste (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*), što je zajednički naziv za radikale

1. UVOD

kisika kao i njegove reaktivne neradikalne derivate: superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), perhidroksilni radikal (HOO^{\bullet}), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina ($HClO$) i drugi. Lipidnu preoksidaciju najčešće uzrokuju hidroksilni radikali (OH^{\bullet}), posebno u metalom kataliziranim reakcijama (Valavanidis i sur., 2006).



Slika 2 Mehanizmi oksidativnog stresa-inducirana stanična oštećenja (preuzeto iz: Agarwal i sur., 2005)

Membrane izložene peroksidaciji gube permeabilnost i integritet, a produkti lipidne peroksidacije predstavljaju stalnu prijetnju aerobnim stanicama. Stanice sadrže antioksidanse, poput vitamina E, za prevenciju početka peroksidacije te razne mehanizme za održavanje integriteta stanične membrane i homeostaze (Dix i Aikens, 1993). Direktna analiza endogenih produkata lipidne peroksidacije je komplicirana te se stoga u većini metoda mjeri razina sekundarnih produkata oksidacije (aldehida i ketona) (Valavanidis i sur., 2006). Najpoznatiji način procjene oštećenja lipida je stvaranje sekundarnog produkta lipidne peroksidacije - malondialdehida (MDA).

U zadnjih nekoliko godina mnoga ekotoksikološka istraživanja proučavala su oksidativni stres kod riba izloženih metalima (Cd, Hg, Cu) i organskim zagađivačima (poliklorirani bifenili – aroklor) (Valavanidis i sur., 2006). Izloženost ovim tvarima

uzrokovala je izraženu lipidnu peroksidaciju i rezultirala povećanom razinom MDA u jetri i ovarijima te utjecala na rast riba.

1.6.3. Ukupni citosolski proteini

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

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

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

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Osnovni cilj ovog istraživanja je odrediti kakvoću vode rijeke Krke primjenom kemijskih i mikrobioloških analiza te biomarkera na dijelu vodotoka koji je pod antropogenim utjecajem grada Knina i predstavlja potencijalnu opasnost za Nacionalni park Krka.

Rijeka Krka sa svojih sedam sedrenih slapišta predstavlja prirodni i krški fenomen ne samo u Republici Hrvatskoj, već i u cijelom svijetu te je dio njezinog toka 1985. godine proglašen nacionalnim parkom (URL 1). Nažalost, ugrožena je zbog nekontroliranog antropogenog utjecaja te je neophodno provoditi sustavno praćenje stanja vode (monitoring) i procjenu utjecaja onečišćenja. U Krku se ulijevaju komunalne otpadne vode stanovništva i tehnološke otpadne vode gospodarstva s područja gradova Knina, Drniša (rijeka Čikola), Skradina te područja Šibenika koji ugrožava Krku vodama iz Šibenskog zaljeva, jer dio onečišćene vodene mase strujama uzvodno u srednjim slojevima dospiju do Skradinskog buka. Kakvoća vode rijeke Krke nizvodno od Knina je 2006. godine bila čak V. kategorije (vrlo loše ekološko stanje) (Program zaštite okoliša Šibensko-kninske županije, 2011), a predstavlja područje smješteno samo 2 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka.

Prema Izvješću o stanju okoliša Šibensko-kninske županije (2010) trenutno se otpadne vode grada Knina izravno, bez pročišćavanja, ispuštaju na tri lokacije: u potok Marčinkovac, rijeku Orašnicu i Krku kod Atlagića mosta, kao i industrijske otpadne vode (bolnica Knin, Dizel-depo, tvornica vijaka DIV d.o.o.) koje nisu priključene na sustav javne odvodnje te se ispuštaju izravno u recipijente. Tehnološke otpadne vode tvornica vijaka DIV d.o.o. stvorile su tijekom godina gomilanja močvarno područje površine preko 3,5 km², koje je iznimno neugodnog mirisa i izgleda te je izvorište zaraze stanovnicima Knina i u posljednje vrijeme predstavlja opasnost koja ugrožava Nacionalni park Krka. Zbog navedenog ovo je područje prozvano „kninska crna jama“.

Postoje svega četiri uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (Skradin, Šibenik, Rogoznica i Golubić) u području sliva rijeke Krke, dok u većini drugih općina ne postoje nikakvi sustavi javne odvodnje te se otpadne vode ispuštaju direktno u prijemnike ili posredno iz crnih jama putem procjeđivanja (Program zaštite okoliša Šibensko-kninske županije, 2011). Grad Knin je u fazi ishoda gradjevinske dozvole za proširenje javnog sustava odvodnje i izgradnju uređaja za pročišćavanje otpadnih voda koji bi riješio pitanje ispuštanja otpadnih voda u rijeku Krku.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Zbog svega navedenog, a u svrhu očuvanja ovog prirodnog krškog fenomena, cilj rada je procijeniti izloženosti vodenog ekosustava esencijalnim i toksičnim metalima, uz praćenje niza fizikalno-kemijskih i mikrobioloških čimbenika kakvoće vode na dijelu vodotoka rijeke Krke koji je pod neposrednim utjecajem tehnoloških i komunalnih otpadnih voda, a smješten je samo 500 m od centra grada Knina i 2 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka. U svrhu procjene antropogenih utjecaja na biotu, određeni su biološki i ekotoksikološki pokazatelji u potočnoj pastrvi (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), kao tipičnom predstavniku ihtiofaune rijeke Krke.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- odrediti ekološko stanje vode rijeke Krke u dijelu vodotoka uz točkaste izvore zagađenja grada Knina praćenjem fizikalno-kemijskih čimbenika;
- procijeniti opterećenje tog dijela vodotoka rijeke Krke metalima određivanjem koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi;
- procijeniti mikrobiološku kakvoću vode rijeke Krke;
- odrediti potencijalni antropogeni utjecaj na organizme koji žive u vodi, mjerenjem koncentracija metala u citosolskoj frakciji jetre pastrva, što predstavlja novi pristup procjene izloženosti metalima jer omogućava mjerenje metala u dijelu stanice u kome su biološki raspoloživi oblici metala te ukazuju na potencijalnu opasnost za organizme;
- odrediti biološke promjene na staničnoj razini (promjene razina ukupnih citosolskih proteina, metalotioneina i malondialdehida) u jetri potočne pastrve;
- pravovremeno ukazati na promjenu kakvoće vode ovog dijela vodotoka rijeke Krke te procijeniti potencijalnu opasnost za Nacionalni park Krka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja – rijeka Krka

Rijeka Krka se nalazi u Dalmaciji na području Šibensko-kninske županije. Tok joj se proteže po Ravnim kotarima, a nadvisuju ga planinski masivi koji uvelike utječu na klimu tog područja. Izvor Krke smješten je nedaleko od grada Knina, u podnožju krške planine Dinare podno Topoljskog buka, zvanog i Veliki buk ili Krčić (Bonacci i Perica, 1990) (Slika 3).



a)



b)

Slika 3 Fotografije dijela vodotoka rijeke Krke: a) Topoljski buk i izvor rijeke Krke; b) dio toka uz grad Knin (snimila Vlatka Filipović Marijić)

Krka je tipična krška rijeka čiji izvor odmah pri izlasku vode iz podzemlja formira snažan tok. Ukupna duljina rijeke iznosi 72,5 km od čega slatkovodni dio čini 49 km, a bočati 23,5 km s ukupnim padom od 242 m (URL 1). Tok rijeke Krke načinio je mnoge duboke kanjone, a ono što je čini izuzetnom je veliki broj jezera i slapova koji su nastali taloženjem sedre, vapnenačkih stijena koje najvećim dijelom nastaju inkrustacijom zajednice mahovina (Bryophyta) i karakterizirane su lakim i brzim trošenjem zbog svoje male tvrdoće (Polšak i sur., 1990). Sedrene barijere grade niz manjih i 7 većih slapova koji predstavljaju krški fenomen: Bilušića buk, Čorića buk (Brljan), Manojlovački slap, Rošnjak, Miljackin slap, Roški slap i Skradinski buk te je zbog svoje ljepote, prirodne i kulturne baštine ovo područje 1985. godine proglašeno nacionalnim parkom. Rijeka se nalazi na samom prijelazu vazdazelene mediteranske i listopadne vegetacije što rezultira velikim brojem različitih prirodnih staništa, a time i velikom bioraznolikošću s brojnim endemičnim i ugroženim vrstama životinjskog i biljnog svijeta.

Slivno područje rijeke Krke je relativno rijetko naseljeno, ali antropogeni utjecaj se može zamijetiti u području oko grada Knina. U rijeku Krku se direktno ispuštaju komunalne gradske otpadne vode bez prethodnog pročišćavanja (Slika 4a), a na ušću rijeke

3. MATERIJALI I METODE

Orašnice u Krku smještena je tvornica vijaka DIV d.o.o., koja svoje tehnološke otpadne vode ispušta na područje veličine preko 3,5 km², poznatom pod nazivom "kninska crna jama", prozvanom tako zbog izgleda otpadnih voda (Slika 4b).



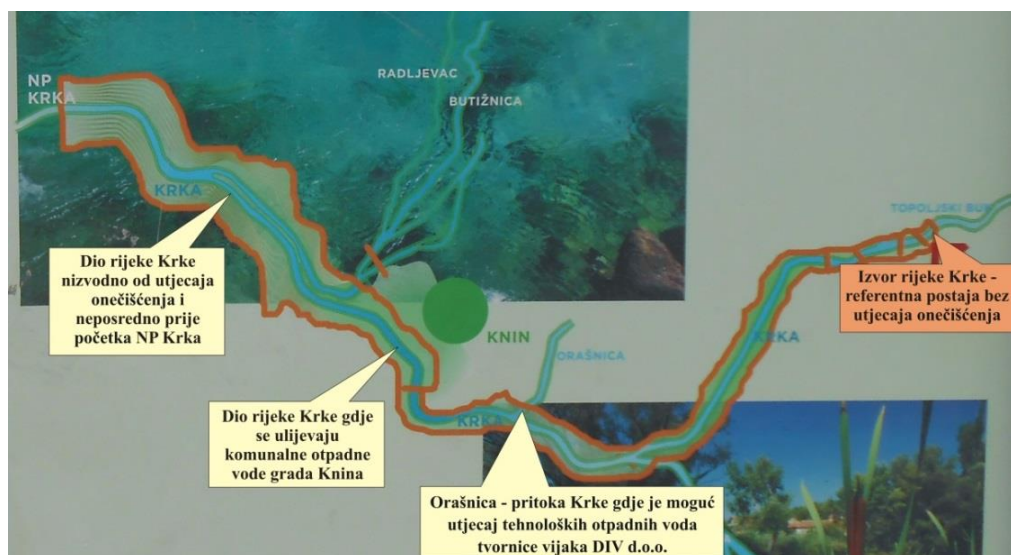
Slika 4 Fotografije točkastih izvora zagađenja na dijelu vodotoka rijeke Krke uz grad Knin: a) komunalne otpadne vode; b) tehnološke otpadne vode tvornice vijaka DIV d.o.o., tzv. "kninska crna jama" (snimila Vlatka Filipović Marijić)

S obzirom da nije provedena sveobuhvatna procjena kakvoće ovog dijela toka rijeke Krke, prepoznata je iznimna važnost ovog istraživanja, kako za lokalnu zajednicu tako i za cijelu Republiku Hrvatsku te je na Natječaju za dodjelu sredstava Zaklade Adris 2014. godine odobreno financiranje projekta „Procjena kakvoće vodotoka rijeke Krke i potencijalne opasnosti za Nacionalni park Krka primjenom novih bioindikatora i biomarkera“, voditeljice dr. sc. Vlatke Filipović Marijić. Sva prikazana istraživanja provedena su u okviru navedenog projekta koji financira Zaklada Adris tijekom 2015./2016. godine.

3.2. Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno tijekom 2015. godine u proljetnom periodu (21. do 24. travnja) na četiri postaje na rijeci Krki. Postaje su izabrane kako bi omogućile procjenu utjecaja točkastih izvora onečišćenja na rijeku Krku u dijelu vodotoka kod grada Knina, smještenog samo 2 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka. Uz grad Knin su izabrane tri lokacije uzorkovanja, a četvrta je izvor rijeke Krke, koja kao područje bez utjecaja onečišćenja služi kao kontrolna postaja (Slika 5).

3. MATERIJALI I METODE



Slika 5 Lokacije uzorkovanja na rijeci Krki: izvor rijeke Krke kao kontrolna postaja bez utjecaja onečišćenja te tri postaje uz grad Knin koje su pod utjecajem onečišćenja

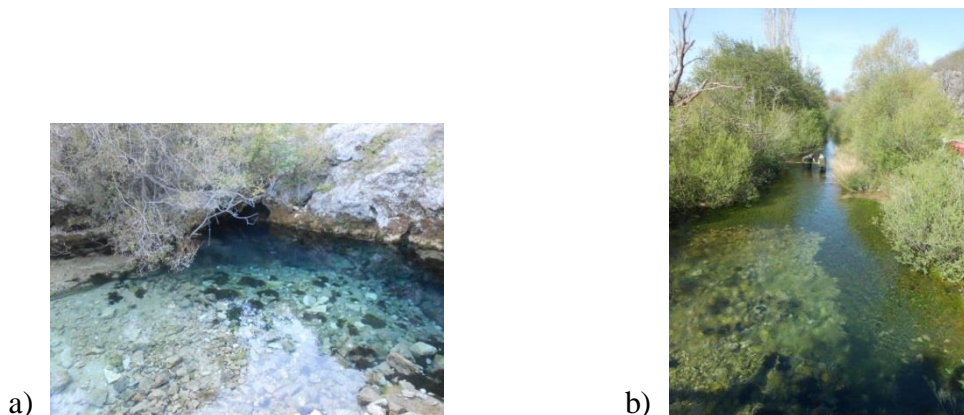
Otpadne vode tvornice vijaka DIV d.o.o se podzemnim putem, a do nedavno dok je nasip bio niži i direktno mogu pri visokom vodostaju ulijevati u rijeku Orašnicu, pritoku rijeke Krke, u kojoj je provedeno uzorkovanje vode i riba (Slika 6a). Uzorkovanje je nastavljeno nizvodno kod dijela toka pod neposrednim utjecajem komunalnih otpadnih voda grada Knina, koje se direktno bez prethodnog pročišćavanja ulijevaju u rijeku Krku (Slika 6b). Radi procjene utjecaja onečišćenja nizvodno od unosa otpadnih voda, uzorkovanje je provedeno i nizvodno od grada Knina, tj. neposredno prije ušća rijeke Butižnice (Slika 6c). Navedene postaje su izabrane kao mjesta utjecaja točkastih izvora onečišćenja na rijeku Krku (Slika 5).



Slika 6 Fotografije postaja na kojima je provedeno uzorkovanje vode i riba: a) u rijeci Orašnici, pritoci rijeke Krke u koju se mogu povremeno ulijevati tehnološke otpadne vode tvornice vijaka DIV d.o.o; b) u rijeci Krki u području izlivanja nepročišćenih komunalnih otpadnih voda grada Knina; c) u rijeci Krki nizvodno od točkastih izvora onečišćenja, prije ušća rijeke Butižnice (snimila Vlatka Filipović Marijić)

3. MATERIJALI I METODE

Kao referentna postaja, odnosno područje bez utjecaja onečišćenja, izabran je izvor rijeke Krke koji je smješten u podnožju planine Dinare, 3,5 km sjeveroistočno od Knina, podno 22 m visokog Topoljskog slapa (Slika 7).



Slika 7 Fotografije postaje na izvoru rijeke Krke gdje je provedeno uzorkovanje: a) vode na izvoru rijeke Krke; b) vode i riba nizvodnije od izvora rijeke Krke (snimila Vlatka Filipović Marijić)

Na navedenim postajama određeni su pojedini fizikalno-kemijski čimbenici *in situ* te uzeti uzorci vode u triplikatu za naknadne fizikalno-kemijske i mikrobiološke analize te određivanje koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi. Sve navedene analize provedene su i u uzorku riječne vode u trenutku izlivanja otpadnih komunalnih voda. Kao indikatorska vrsta za procjenu mogućeg utjecaja onečišćenja na biotu izabrana je potočna pastrva (*Salmo trutta*), tipičan predstavnik ihtiofaune rijeke Krke.

3.3. Indikatorski organizam - potočna pastrva

Potočna pastrva (*Salmo trutta*) slatkovodna je riba koja pripada porodici pastrva (Salmonidae) (Slika 8). Rasprostranjena je diljem Europe te se može pronaći u hladnim vodama sjeverno od Španjolske. Svojim lateralno spljoštenim tijelom i vretenastim oblikom prilagođena je za život u brzim vodotocima bogatim kisikom. Tijelo odrasle jedinke može doseći dužinu od 15 do maksimalno 70 cm te masu od 100 g do 6 kg, ovisno o starosti jedinke i resursima u okolišu. Vrsta je karakterizirana crnim i crvenim točkama s bijelim obrubom na lateralnim stranama i po leđima, dok boja same kože varira ovisno o staništu u kojem se nalazi. Površina tijela potočne pastrve prekrivena je dobro razvijenim cikloidnim ljuskama uz pomoć kojih se može odrediti starost pojedine ribe (Maitland i Linsell, 2009).

3. MATERIJALI I METODE



Slika 8 Potočna pastrva (*Salmo trutta*) iz rijeke Krke (snimila Vlatka Filipović Marijić)

Zbog svoje mobilnosti, ribe nisu uzorkovane na većem broju postaja kao uzorci vode, već malo nizvodnije od izvora rijeke Krke i na dijelu toka uz točkaste izvore zagađenja kod grada Knina. Ulov riba odobrila je Uprava ribarstva Ministarstva poljoprivrede (525-13/0545-15-2), a proveden je primjenom elektro-agregata prema normi HRN EN 14011 (2005) (Slika 9), nakon čega su jedinke u visokim plastičnim posudama s aeriranom riječnom vodom dopremljene do laboratorija u Kninu. Usmrćivanje i izolaciju tkiva riba su proveli članovi Laboratorija za biološke učinke metala koji je registriran pri Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede za usmrćivanje riba te rad na izoliranim organima, tkivima i trupovima životinja koje su usmrćene u tu svrhu (HR-POK-025). Ribe su usmrćene primjenom anestetika MS-222 (Sigma, SAD).



Slika 9 Elektro-agregat za omamljivanje riba EL63II-GI (Hans Grassl GmbH, Njemačka) snage 5,0 kW (snimila Vlatka Filipović Marijić)

3.4. Određivanje biometrijskih parametara riba

Jedinkama su određeni osnovni biometrijski pokazatelji:

- ukupna dužina – od početka glave do kraja repne peraje (cm)
- ukupna masa (g)
- masa jetre i gonada (g)

3. MATERIJALI I METODE

- Fultonov kondicijski indeks (g cm^{-3}) x 100: (ukupna masa (g)/ukupna dužina (cm^3)) x 100
- Hepatosomatski indeks (%): (masa jetre (g)/ukupna masa (g)) x 100
- Gonadosomatski indeks (%): (masa gonada (g)/ukupna masa (g)) x 100
- spol – određen je vizualno, a po potrebi pregledom nativnih preparata gonada svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 100x

Odvojeno tkivo jetre je u terenskom laboratoriju pohranjeno u tekući dušik na $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je tako prevezeno do Instituta Ruđer Bošković gdje je pohranjeno u zamrzivač na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje obrade tkiva.

3.5. Mjerenje fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode

Tijekom rada na terenu na odabranim postajama neposredno (*in situ*) su sondom SevenGo (Mettler Toledo) izmjereni sljedeći fizikalno-kemijski čimbenici: temperatura, vodljivost, ukupno otopljene soli, pH, oksidacijsko-redukcijski potencijal te količina otopljenog kisika i zasićenje kisikom. Za ostale analize su istovremeno uzeti uzorci vode od 0,5 L, pohranjeni na tamno mjesto te držani na temperaturi od $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ do obrade u laboratoriju, gdje su još određene koncentracije iona hranjivih soli (nitrita, nitrata, orto- fosfata, amonij, ukupni dušik i fosfor), količina otopljenog slobodnog ugljičnog dioksida (CO_2), kemijska potrošnja kisika (KPK), *m*-alkalitet te karbonatna i ukupna tvrdoća vode. Metode za određivanje pojedinih čimbenika opisane su u Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (2012).

Količina otopljenog slobodnog CO_2 je određena standardnom titracijskom metodom s otopinom Na_2CO_3 uz dodatak fenolftaleina, a KPK prema standardnoj metodi HRN EN ISO 8467:2001. Ukupni dušik je određen oksidativnom digestijom s peroksodisulfatom (EN ISO 11905-1:1997), ukupni fosfor s amonijevim molibdatom, a količina amonijaka kolorimetrijski. UV/VIS spektrofotometrom (HACH DR 6000, SAD) su određeni ortofosfati metodom s askorbinskom kiselinom, količina nitrita metodom diazotiranja te količina nitrata metodom redukcije kadmijem. Titracijom uzorka vode s H_2SO_4 uz metiloranž kao indikator određen je alkalitet te se naziva *m*-alkalitet (metiloranž- alkalitet). Titrimetrijski je određena tvrdoća vode, karbonatna s HCl, a ukupna tvrdoća vode s EDTA.

3. MATERIJALI I METODE

3.6. Mjerenje mikrobioloških čimbenika kakvoće vode

Uzorci vode za mikrobiološku pretragu su uzeti u sterilne polietilenske boce od 1 L i pohranjeni u terenske hladnjake do laboratorijske obrade. Fekalne indikatorske bakterije, ukupni koliformi i *Escherichia coli*, određene su primjenom Colilert® testova i Quanti/Tray 2000 prema uputama proizvođača (IDEXX Laboratories, SAD). Uzorci su inkubirani kroz 24 h na 35 °C, a rezultati izraženi kao najvjerojatniji broj (MPN) u 100 mL uzorka. Najvjerojatniji broj enterokoka je korišten upotrebom Enterolert® test i Quanti/Tray 2000 prema uputama proizvođača (IDEXX Laboratories, SAD). Najvjerojatniji broj fekalnih bakterija i enterokoka određen je na temelju pozitivnih jažica pod UV svjetlom koje su očitane upotrebom IDEXX MPN Generatora 3,2 (IDEXX Laboratories, SAD) kao najvjerojatniji broj bakterija u 100 mL vode (MPN 100 mL⁻¹). Za određivanje ukupnog broja bakterija (CFU) uzorci vode su razrijeđeni sa sterilnom Ringerovom otopinom pH 6,0 (Pliva) i inokulirani metodom razlijevanja po podlozi na Yeast extract agaru (EN ISO 6222:1999). Nakon inkubacije od 24 h na 35 °C i do 5 dana na 22 °C prebrojane su izrasle bakterijske kolonije te su rezultati izraženi za 1 mL vode (CFU mL⁻¹).

3.7. Određivanje koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi

Uzorci riječne vode uzeti su u triplicatu na navedenim postajama. Prilikom rukovanja korištene su gumene rukavice bez pudera, a voda je stavljena u plastične polietilenske boce (25 mL), prethodno isprane dušičnom kiselinom (v/v 10 %, p.a., Kemika, Hrvatska) te Mili-Q vodom. Uzorci su profiltrirani odmah na terenu, koristeći filtere s porama veličine 0,45 µm (Sartorius, Njemačka), zakiseljeni s dušičnom kiselinom (v/v 1 %; Suprapur, Merck, Njemačka), a zatim pohranjeni na 4 °C do daljnje laboratorijske obrade.

Metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) (Slika 10) provedeno je mjerenje ukupne koncentracije 21 mikro- i 3 makro-elementa u vodi. HR ICP-MS je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrofotometrijom. Koncentracija mikroelemenata izmjerena je direktno iz uzetih uzoraka, dok je koncentracije makroelemenata u riječnoj vodi mjerena nakon razrjeđenja uzoraka deset puta. Mjerenje berilija (⁹Be), litija (⁷Li), rubidija (⁸⁵Rb),

3. MATERIJALI I METODE

^{95}Mo , ^{111}Cd , antimona (^{121}Sb), talija (^{205}Tl), ^{208}Pb i urana (^{238}U) je provedeno korištenjem niske rezolucije, ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , titana (^{47}Ti), vanadija (^{51}V), ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{79}Se , ^{86}Sr , barija (^{138}Ba) srednje, a ^{39}K i ^{75}As visoke rezolucije.

Eksterna kalibracija je provedena pripremom odgovarajućih standardnih otopina u 5 % HNO_3 (Suprapur, Merck, Njemačka) iz multielementnih standardnih otopina za metale u tragovima (100 mg L^{-1} , Analitika, Republika Češka) i za makroelemente ($\text{Mg } 0,4 \text{ g L}^{-1}$; $\text{Na } 1,0 \text{ g L}^{-1}$; $\text{K } 2,0 \text{ g L}^{-1}$; Fluka, Njemačka). U svaki uzorak, kalibracijski standard i slijepu probu, prije mjerenja metala potrebno je dodati interni standard indij ($\text{In}, 1 \mu\text{g L}^{-1}$, Fluka, Njemačka) i HNO_3 (Suprapur, Merck, Njemačka) čija je konačna koncentracija u uzorcima iznosila v/v 2 %. Slijepa proba služi samo za detekciju eventualnih pogrešaka u analizi i ona sadrži samo interni standard In i kiselinu.



Slika 10 Maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS) (snimila Vlatka Filipović Marijić)

Uz uzorke se redovito tokom mjerenja određuju koncentracije metala u certificiranim materijalima prirodnih voda poznate koncentracije što osigurava točnost mjerenja te su makroelementi mjereni u 10 puta razrijeđenom certificiranom uzorku QC Minerals (Catalog number 8052, UNEP GEMS, Burlington, Canada), a mikroelementi u certificiranom referentnom uzorku riječne vode SLRS-4 – river water from Ottawa River (Ontario, Canada, National Research Council Canada).

3. MATERIJALI I METODE

3.8. Obrada tkiva jetre u svrhu određivanja koncentracija citosolskih metala i staničnih biomarkera

Homogenizacija je postupak kojim se istiskuje stanična tekućina iz tkiva. Provedena je uz pomoć homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Potter-Everhjem GLAS-COL, SAD) pri 6000 okretaja u minuti. Uzorci, kao i sav potrebni pribor i kemikalije, drže se na ledu tokom cijelog postupka. Uzorci jetre su homogenizirani u TrisHCl/Base puferu, pH = 8,5 (4 °C) (Sigma, SAD) koji je priređen kao 100 mM za mjerenje MDA i citosolskih metala, odnosno 20 mM za MT i citosolske proteine. U pufer su dodani inhibitori proteolitičke aktivnosti (0,5 mM fenil-metilsulfonil- fluorid (PMSF, Sigma, SAD), otopljen u etanolu) i 0,006 mM leupeptin (LEU, Sigma, SAD), otopljen u 20 mM Tris-HCl) te reducens 1 mM ditioneitol (DTT, Sigma SAD), koji sprječava oksidaciju proteina na zraku. Prije homogenizacije je dio tkiva jetre razrijeđen rashlađenim puferom 6 puta za mjerenje MDA i citosolskih metala te je nakon homogenizacije centrifugiran u Avanti J-E centrifugi (BeckmanCoulter, SAD) 10 min. na 3000xg, 4 °C, pri čemu je odvojeno u duplikatu 250 µL supernatanta za mjerenje MDA biomarkera, a ostatak je centrifugiran 120 min. na 50000xg, 4 °C te su u ovoj vodotopivoj citosolskoj frakciji (S50) određene koncentracije citosolskih metala. Drugi dio tkiva jetre je razrijeđen 5 puta s rashlađenim puferom te se nakon homogeniziranja i centrifugiranja 120 min. na 50000xg, 4 °C u dobivenoj citosolskoj frakciji određuju ukupni citosolski proteini i MT.

3.9. Određivanje koncentracija metala u staničnom citosolu jetre potočne pastrve

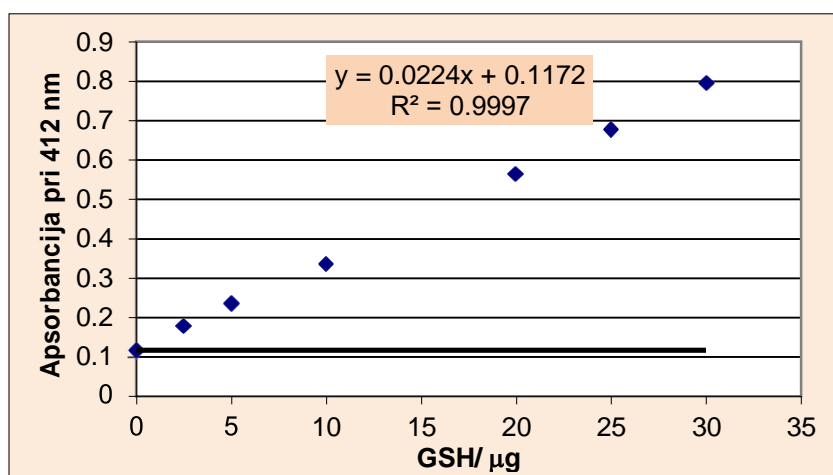
Mjerenje citosolskih metala provodi se u citosolskoj frakciji (S50), koja se prethodno mora razrijediti 10 puta s Mili-Q vodom kako bi bila u koncentracijskom rasponu za određivanje mikroelemenata, odnosno 100 puta za određivanje makroelemenata. Određivanje koncentracije metala u staničnom citosolu provedeno je metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2, Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka). Detaljan opis metode te mjernog postupka opisan je u poglavlju 3.5. Određivanje koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi. U citosolu jetre su uz metale izmjerene u vodi još prikazane koncentracije ^{109}Ag , ^{209}Bi i ^{133}Cs , koje nismo prikazali za vodu jer su im koncentracije bile ispod granice detekcije instrumenta.

3. MATERIJALI I METODE

3.10. Određivanje staničnih biomarkera

3.10.1. Određivanje koncentracije metalotioneina

Koncentracija MT u jetri potočne pastrve određena je prema metodi opisanoj u radu Viarengo i sur. (1997; 2000) koja je prilagođena na metodu za mikroploču (250 μ l volumen uzorka umjesto 1 ml u standardnoj metodi). Metoda se temelji na etanolnoj precipitaciji, nakon koje slijedi spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih -SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa. Prilikom etanolne precipitacije dolazi do diferencijalnog fracioniranog taloženja proteina mješavinom organskih otapala etanola i kloroforma. Najprije se iz citosola S50 uklanjaju visokomolekularni proteini, a zatim se iz preostalog supernatanta taloži frakcija bogata niskomolekularnim proteinima- MT. U djelomično pročišćenom i koncentriranom uzorku MT njihova koncentracija se određuje spektrofotometrijski, na temelju reakcije tiolnih skupina cisteina s 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB, Ellmanov reagens, Sigma, SAD). Za određivanje sadržaja slobodnih -SH skupina pripremljen je referentni standard- reducirani glutation (GSH, Serva, Njemačka) u koncentracijskom rasponu 2,5-30 μ g. Na temelju očitanih apsorbanci pri 412 nm na fotometru (Tecan Infinite M200, Švicarska) se iz dobivenog kalibracijskog pravca odredila koncentracija MT u analiziranim uzorcima (Slika 11), kao mg g^{-1} mokre mase tkiva ili $\mu\text{g mg}^{-1}$ ukupnih citosolskih proteina nakon dijeljenja s koncentracijom proteina.



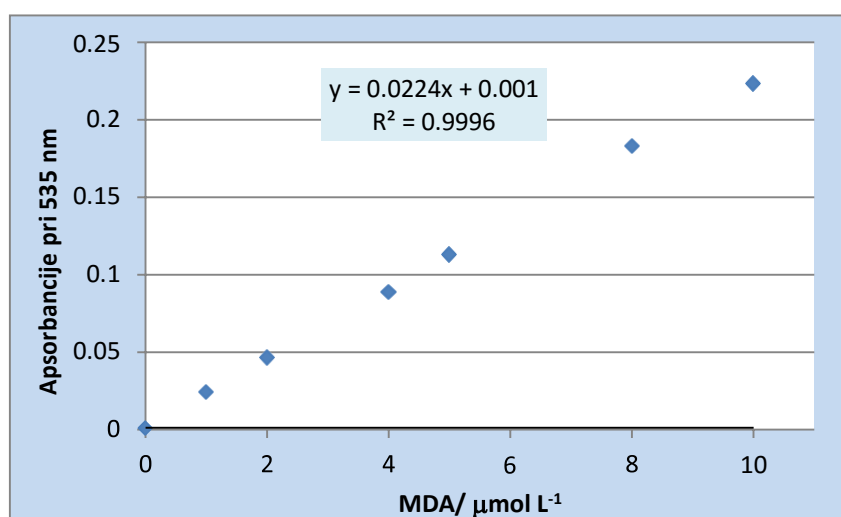
Slika 11 Kalibracijski pravac prema kojem je određena koncentracija MT u jetri potočne pastrve. Prikazana je linearna ovisnost apsorbancije na 412 nm o koncentraciji -SH skupina referentnog standarda GSH nakon reakcije s DTNB.

3. MATERIJALI I METODE

3.10.2. Određivanje koncentracije malondialdehida

Za određivanje koncentracije MDA potrebno je pripremiti 10 % trikloroetenu kiselinu (TCA, Kemika, Hrvatska), 1 % butilirani hidroksitoluen (BHT, Sigma, SAD) otopljen u apsolutnom etanolu, tiobarbituratnu kiselinu (TBA, Sigma, SAD) te 3 mM 1,1,3,3,-tetraetoksi-propan (TEP, Sigma, SAD) standard koji se priprema otapanjem u 1N HCl (*Suprapur*, Merck, Njemačka). U 250 μL uzorka se dodaju TCA i TBA, uzorci se stave na 4 °C 15 min. te zatim centrifugiraju 15 min. na 4000xg, 4 °C. Zatim se doda TBA te slijedi zagrijavanje uzoraka u grijaćem bloku 30 min. na 100 °C i nakon hlađenja se očitava apsorbancija na 535nm na fotometru (Tecan Infinite M200, Švicarska). Tijekom provođenja cijelog postupka potrebno je uzorke držati na ledu kako bi se spriječila daljnja oksidacija, a iz istog razloga se dodaje i BHT.

Metoda se temelji na raspadu lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti (Botsoglou i sur., 1994). Reakcijom jedne molekule MDA i dvije molekule TBA stvara se ružičasto fluorescentni MDA-TBA kompleks koji apsorbira UV zračenje pri 535 nm. Iz kalibracijskog pravca, koji se određuje iz koncentracijskog raspona MDA 1-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koji se pripreme razrjeđivanjem 3 mM MDA s puferom za homogenizaciju, očitava se koncentracija MDA (izražena kao nmol g^{-1} mokre mase tkiva) koja je proporcionalna intenzitetu nastalog obojenja (Slika 12).



Slika 12 Kalibracijski pravac prema kojem je određena koncentracija MDA u jetri potočne pastirve.

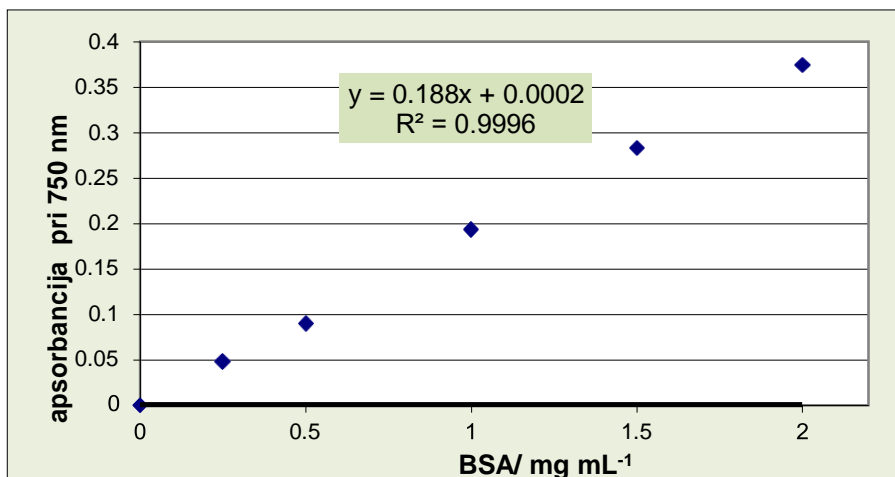
3. MATERIJALI I METODE

3.10.3. Određivanje koncentracije ukupnih citosolskih proteina

Koncentracije ukupnih proteina se određuju u izoliranoj citosolskoj frakciji (S50) kolorimetrijskom metodom po Lowry-u (Lowry i sur., 1951). Metoda se zasniva na dva različita koraka koja vode do konačnog obojenja proteina: reakcija s bakrom u lužnatoj otopini i redukcija Folinovog reagensa. U prvom koraku dolazi do reakcije Cu^{2+} iona (reagens A, bazična otopina bakrovog tartarata, Bio Rad, SAD) s proteinima, koji se u lužnatom mediju vežu na peptidne veze i reduciraju u Cu^+ te nastaje kompleks Cu^+ -protein. U drugom koraku nastali kompleks reagira s Folinovim reagensom (reagens B, Bio Rad, SAD) pri čemu se razvija karakteristično plavo obojenje. Obojenje primarno uzrokuju aminokiseline tirozin i triptofan, te manje cistin, cistein i histidin jer njihovi ogranci zajedno s Cu^+ reagiraju s Folinovim reagensom. Intenzitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s reagensima proporcionalan je apsorbiranom zračenju, odnosno koncentraciji proteina.

Uzorke je bilo potrebno prije mjerenja razrijediti 25 puta jer su koncentracije proteina u citosolskim frakcijama jetre riba više od gornje granice linearnosti kalibracijskog pravca te je svaki uzorak priređen u duplikatu. Zatim je po 5 μL svakog uzorka i standarda nanoseno u duplikatu na mikroploču s jažicama. Nakon toga se u jažice dodaje 25 μL reagens A i 200 μL reagens B te se sadržaj promiješa u mini miješalici (Ika Works, Njemačka). Mikroploča se ostavi na tamnom mjestu 15 minuta dok se ne razvije maksimalno obojenje. Koncentracije citosolskih proteina su određene spektrofotometrijski na 750 nm valne duljine na fotometru (Tecan Infinite M200, Švicarska), a očitane su iz kalibracijskog pravca koji je dobiven očitanjima apsorbancije otopine albumina goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*) priređene u rasponu 0,25-2,0 mg mL^{-1} , razrjeđivanjem s puferom za homogeniziranje. Iz dobivenog kalibracijskog pravca (Slika 13) očitavaju se koncentracije ukupnih proteina i izražavaju kao $\text{mg proteina mL}^{-1}$ citosolske frakcije. Ako se ova koncentraciju pomnoži s faktorom razrjeđenja tkiva (5 puta) dobiva se koncentracija ukupnih proteina izražena kao mg g^{-1} tkiva.

3. MATERIJALI I METODE



Slika 13 Kalibracijski pravac prema kojem je određena koncentracija ukupnih citosolskih proteina u jetri potočne pastrve

3.11. Statistička obrada podataka

Statistička analiza je provedena u računalnom programu SigmaPlot 11.0 i SPSS Statistics 20. Usporedba podataka među postajama za uzorke vode provedena je jednosmjernom analizom varijanci (jednosmjerna ANOVA, eng. *Analysis of Variance*) ili u slučaju neravnomjerne raspodjele dobivenih podataka Kruskal-Wallis testom. Za višestruku usporedbu između parova korišteni su "*post hoc*" Tukey ili Dunnov test. Za ribe, koje su uzorkovane samo na dvije postaje, usporedba rezultata je provedena uz primjenu t-testa, a razine značajnosti istaknute su u tekstu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti.

4. REZULTATI

4.1. Fizikalno-kemijski čimbenici kakvoće vode

U svrhu procijene kakvoće vode rijeke Krke određeni su opći fizikalno-kemijski čimbenici koji karakteriziraju toplinsko stanje vode, uvjete režima kisika i hranjive tvari na svakoj postaji uzorkovanja. Uz čimbenike koji su kategorizirani u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 89/2010) upisane su i kategorije stanja vode: I. – vrlo dobro, II. – dobro, III. – umjereno, IV. – loše, V. – vrlo loše (Tablica 1).

Temperatura vode rijeke Krke najniža je na izvoru, gdje iznosi 9,8 °C, dok na nizvodnim postajama uzorkovanja raste do 14 °C, odnosno u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda. Jednak trend ima i zamućenost vode, koja je najviša u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda. Količina otopljenih soli (TDS) također ukazuje na utjecaj onečišćenja uz grad Knin, gdje je raspon vrijednosti od 212 do 272 $\mu\text{S cm}^{-1}$, a u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda čak poraste na 505 $\mu\text{S cm}^{-1}$ u odnosu na izvor gdje je vrijednost 179,6 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Zabilježene su niske vrijednosti *m*-alkaliteta (određen uz indikator metiloranž), koje su na izvoru rijeke Krke 2,98, a na ostalim postajama se kreće u rasponu od 3,42 do 4,53. Karbonatna (KT) i ukupna (UT) tvrdoća vode su najniže na izvoru, a više vrijednosti su zabilježene uz grad Knin, za KT u rasponu od 9,58 do 12,68, a za UT od 10,68 do 13,46, gdje su obje maksimalne vrijednosti izmjerene u trenutku otpuštanja komunalnih otpadnih voda (Tablica 1).

Parametri koji su kategorizirani u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 89/2010) potvrđuju pogoršanje kakvoće vode uz točkaste izvore zagađenja grada Knina, osim pH vrijednosti koje su se kretale unutar raspona od 7,45 do 8,24 i sve potvrđuju vodu dobrog ekološkog stanja. Isto potvrđuju i uobičajene vrijednosti oksido-redukcijskog potencijala (ORP) za slatkovodne ekosustave koje se kreću na svim postajama u rasponu od -13,5 do -59,5 mV. Električna vodljivost povišena je na postajama uz grad Knin što ukazuje na utjecaj onečišćenja, a pogoršanje kakvoće vode iz I. kategorije u II. zabilježeno je kod tvornice vijaka DIV d.o.o., odnosno u V. kategoriju (voda jako loše kakvoće) prilikom otpuštanja komunalnih otpadnih voda.

Čimbenici režima kisika potvrđuju pogoršanje kakvoće vode na dijelu vodotoka rijeke Krke uz grad Knin. Koncentracija otopljenog kisika i zasićenje kisikom prilikom otpuštanja komunalnih voda ukazuju na vrlo lošu kakvoću vode (V. kategorija), kada zasićenje kisikom padne na samo 1,3 %, dok je u ostalim slučajevima voda I. kategorije. Prema kemijskoj potrošnji kisika (KPK) je voda uz grad Knin, a i nizvodno prema rijeci Butižnici V. kategorije, odnosno jako lošeg ekološkog stanja (Tablica 1).

4. REZULTATI

Tablica 1 Vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika kakvoće vode rijeke Krke (označene su I.-V. kategorije kakvoće voda prema NN 89/2010)

	Izvor rijeke Krke	“Kninska crna jama”- ušće rijeke Orašnice u rijeku Krku uz tvornicu vijaka DIV d.o.o.	Dio toka rijeke Krke uz komunalni ispušt grada Knina (uzorak uzet tijekom ispuštanja otpadnih voda)	Dio toka rijeke Krke uz komunalni ispušt grada Knina (uzorak uzet kad se ne ispuštaju otpadne vode)	Dio toka rijeke Krke nizvodno od utjecaja zagađenja (uzvodno od ušća rijeke Butižnice)
Zamućenost/ FAU	0	2	11	3	2
Temperatura vode/ °C	9,8	13,4	14,0	13,1	10,6
pH	7,96 II	8,07 II	7,45 II	8,24 II	8,09 II
<i>m</i> -alkalitet/ mg CaCO ₃ L ⁻¹	2,98	3,56	4,53	3,87	3,42
Električna vodljivost/ μS cm ⁻¹	357 I	551 II	1011 V	430 I	423 I
TDS/ mg L ⁻¹	179,6	275	505	215	212
ORP/ mV	-28,4	-50,5	-13,5	-59,5	-50,6
Otopljeni kisik/ mg O ₂ L ⁻¹	10,43 I	12,76 I	0,13 V	11,7 I	13,9 I
Zasićenje kisikom/ %	96,6 I	123,4 I	1,3 V	114,3 I	120,6 I
KPK - Mn/ mg O ₂ L ⁻¹	3,5 I	42 V	47 V	17 V	8,1 V
Otopljeni CO ₂ / mg L ⁻¹	2,27	1,12	1,04	1,27	1,54
Amonij/ mg N L ⁻¹	<0,1 I	0,22 II	0,31 III	0,19 II	0,14 II
Ukupni dušik/ mg N L ⁻¹	0,3 I	15,4 V	20,1 V	12,3 V	3,0 III
Ukupni fosfor/ mg P L ⁻¹	<0,01 I	1,15 V	2,00 V	1,00 V	0,52 V
Nitrati/ mg N L ⁻¹	0,1 I	3,0 IV	10,8 V	1,3 II	2,5 IV
Nitriti/ mg N L ⁻¹	0,006 I	0,984 V	0,696 V	0,399 V	0,010 II
Ortofosfati/ mg P L ⁻¹	<0,01	0,14	1,04	0,03	0,02
KT/ °dH	8,34	9,97	12,68	10,84	9,58
UT/ °dH	10,21	10,77	13,46	11,32	10,68

4. REZULTATI

Hranjive soli također ukazuju na izraziti pad kakvoće vode uz antropogeni utjecaj zagađenja kod grada Knina. Uočava se povećanje koncentracija hranjivih soli (nitrati, nitriti, ortofosfati, ukupna količina otopljenog fosfora, amonijaka i dušika) na postajama uz grad Knin i nizvodno od njega, gdje je kakvoća vode od II.-V. kategorije, ovisno o čimbeniku. Na izvoru rijeke Krke sve su vrijednosti niske te ukazuju na vodu I. kategorije, odnosno dobrog ekološkog stanja (Tablica 1).

4.2. Mikrobiološka kakvoća vode rijeke Krke

Na temelju činjenice da se komunalne otpadne vode otpuštaju u rijeku Krku bez prethodnog adekvatnog pročišćavanja, određena je i mikrobiološku analizu vode rijeke Krke. Koliformne bakterije i fekalni streptokoki ili enterokoki su najpodobnija grupa indikatorskih bakterija za vrednovanje higijenske kakvoće vode. U Tablici 2 se vide rezultati određivanja fekalnih indikatorskih bakterija (ukupni koliformi, *Escherichia coli*, broj enterokoka) te broj *Pseudomonas aeruginosa* koja može izazvati infekcije u ljudi te ukupni broj bakterija (CFU) na 22 °C i 35 °C (Tallon i sur., 2005).

Tablica 2 Rezultati mikrobiološke kakvoće vode rijeke Krke

	Izvor rijeke Krke	“Kninska crna jama”- ušće rijeke Orašnice u rijeku Krku uz tvornicu vijaka DIV d.o.o.	Dio toka rijeke Krke uz komunalni ispust grada Knina (uzorak uzet tijekom ispuštanja otpadnih voda)	Dio toka rijeke Krke uz komunalni ispust grada Knina (uzorak uzet kad se ne ispuštaju otpadne vode)	Dio toka rijeke Krke nizvodno od utjecaja zagađenja (uzvodno od ušća rijeke Butižnice)
Ukupni koliformi (MPN 100 mL ⁻¹)	1,5	4443,25	17328900,0	447905,0	963,15
<i>Escherichia coli</i> (MPN 100 mL ⁻¹)	1,0	395,85	2571285,0	222075	86,0
Enterokoki (MPN 100 mL ⁻¹)	< 1,0	68,85	648820,0	11990,0	10,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MPN 100 mL ⁻¹)	< 1,0	16,65	12285,05	346,65	1,0
Ukupan broj bakterija na 22°C (CFU mL ⁻¹)	12	19 x 10 ⁴	53,7 x 10 ⁵	19,4 x 10 ⁵	96 x 10 ²
Ukupan broj bakterija na 35°C (CFU mL ⁻¹)	1	10 x 10 ¹	58,0 x 10 ³	17,2 x 10 ³	50

Očigledan je porast svih analiziranih bakterija u dijelu vodotoka pod antropogenim utjecajem uz grad Knin. Trend porasta broja bakterija je usporediv i za sve, u odnosu na izvor, raste slijedom: “kninska crna jama” < komunalni ispust < komunalni ispust (u

4. REZULTATI

trenutku ispuštanja otpadnih voda) (Tablica 2). Nizvodno od grada Knina i točkastih izvora zagađenja (prije ušća rijeke Butižnice u Krku) broj bakterija se smanjuje, ali na vrijednosti koje su još dosta više od onih izmjerenih na izvoru rijeke Krke (Tablica 2).

4.3. Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke

Za razliku od fizikalno-kemijskih i mikrobioloških čimbenika, podaci o ukupno otopljenim koncentracijama metala u vodi su prikazani za šest lokacija, jer su mjerenja provedena i na postaji gdje je proveden ulov riba, koja je bila nešto nizvodnije od izvora rijeke Krke. Svi izmjereni metali, 21 mikroelement i 3 makroelementa, imaju najniže vrijednosti na izvoru rijeke Krke. Očigledan je trend porasta koncentracija metala prema točkastim izvorima zagađenja grada Knina, odnosno ispustu tehnoloških otpadnih voda tvornice vijaka DIV d.o.o. te gradskom ispustu komunalnih otpadnih voda. Metali čije su vrijednosti najviše u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda u odnosu na druge postaje su Cu, Fe, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, a statistički su značajno povišene vrijednosti Al, As, Ba, Cd, Co, Li, Mn, Mo, Ti, V, K i Na. Na području rijeke Orašnice uz „kninsku crnu jamu“ su statistički značajno povišene koncentracije Sr, U, Zn i Mg u odnosu na druge postaje, dok su koncentracije Be usporedive u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda i uz „kninsku crnu jamu“. Ako zanemarimo trenutno izmjerene vrijednosti metala u trenutku ispuštanja komunalnih voda grada Knina, i usporedimo samo ostale postaje, onda je očigledno da su koncentracije svih metala najviše u dijelu toka uz „kninsku crnu jamu“, izuzev Cu čije su vrijednosti najviše uz komunalni ispust. Utjecaj tehnoloških otpadnih voda tvornice vijaka DIV d.o.o. se očitovao u statistički značajno povišenim vrijednostima u odnosu na druge postaje za Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Li, Mn, Mo, Ni, Sb, Sr, Ti, U, V, Zn, K, Mg i Na. Nakon očiglednog antropogenog utjecaja koji rezultira povišenim koncentracijama metala na dijelu toka uz grad Knin, vrijednosti izmjerene nizvodno na dijelu toka prije ušća Butižnice su za sve metale niže u odnosu na onečišćene postaje, a za As, Ba, Be, Cd, Cu, Mo, Pb, Rb, Sb, Se, U, V, K, Mg i Na su čak usporedive s njihovim koncentracijama na izvoru rijeke Krke (Tablica 3).

4. REZULTATI

Tablica 3 Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi ($\mu\text{g L}^{-1}$ za mikroelemente; mg L^{-1} za makroelemente, srednja vrijednost \pm S.D.) rijeke Krke. Istaknuta je statistički značajna razlika u koncentracijama metala između pojedinih postaja (jednosmjerna ANOVA/Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) različitim slovima (a, b, c, d, e – isto slovo označava da ne postoji, a različito da postoji značajna razlika)

	Izvor rijeke Krke	Dio toka nizvodno od izvora rijeke Krke (mjesto ulova ribe)	“Kninska crna jama”- ušće rijeke Orašnice u rijeku Krku uz tvornicu vijaka DIV d.o.o.	Dio toka rijeke Krke uz komunalni ispuštanje grada Knina u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda	Dio toka rijeke Krke uz komunalni ispuštanje grada Knina	Dio toka rijeke Krke uzvodno od ušća rijeke Butižnice
Al	2,40 \pm 1,47 a	2,57 \pm 0,50	3,96 \pm 1,27 a	28,11 b	3,54 \pm 2,10 a	5,22 \pm 2,38 a
As	0,11 \pm 0,01 a	0,12 \pm 0,01 a, c, e	0,19 \pm 0,02 b	1,13 \pm 0,03 d	0,15 \pm 0,01 c	0,14 \pm 0,01 e
Ba	4,38 \pm 0,11 a	4,69 \pm 0,01	10,1 \pm 0,17 b	48,4 \pm 0,63 b	5,69 \pm 0,01	5,48 \pm 0,06
Be	0,002	0,002	0,003 \pm 0,001	0,003 \pm 0,001	0,0013 \pm 0,0006	0,002
Cd	0,009 \pm 0,001 a	0,007 a	0,016 \pm 0,004 b	0,03 \pm 0,001 b	0,008 \pm 0,002 a	0,009 \pm 0,002 a
Co	0,01 \pm 0,004 a	0,009 \pm 0,001 a	0,53 \pm 0,009 b	0,70 \pm 0,01 d	0,04 \pm 0,001 c	0,03 \pm 0,001 e
Cu	0,16 \pm 0,03	0,26 \pm 0,16	0,23 \pm 0,03	1,86 \pm 0,05	0,28 \pm 0,13	0,20 \pm 0,12
Fe	0,34 \pm 0,06	0,53 \pm 0,15	72,1 \pm 21,6	210,5	11,6 \pm 1,89	7,62 \pm 1,02
Li	0,15 \pm 0,006 a	0,17	1,52 \pm 0,03 b	2,71 \pm 0,05 b	0,48 \pm 0,006	0,42 \pm 0,003
Mn	0,014 \pm 0,004 a	0,05 \pm 0,007	60,6 \pm 4,48 b	94,7 \pm 5,43 b	6,730,10	5,24 \pm 0,08
Mo	0,38 \pm 0,005 a	0,40 \pm 0,01	1,0 \pm 0,01 b	2,76 \pm 0,02 b	0,51 \pm 0,02	0,46 \pm 0,006
Ni	0,02 \pm 0,02 a	0,09 \pm 0,07 a	1,30 \pm 0,08 b	3,22 \pm 0,08 c	0,14 \pm 0,04 a	0,11 \pm 0,04 a
Pb	0,017 \pm 0,01	0,017	0,05 \pm 0,02	0,69 \pm 0,06	0,04 \pm 0,01	0,016 \pm 0,01
Rb	0,28 \pm 0,005	0,27 \pm 0,008	0,81 \pm 0,01	11,3 \pm 0,04	0,46 \pm 0,01	0,29 \pm 0,007
Sb	0,018 \pm 0,001 a	0,019 \pm 0,001	0,05 \pm 0,001 b	2,25 \pm 0,05 b	0,03 \pm 0,002	0,02 \pm 0,001
Se	0,22 \pm 0,03	0,22 \pm 0,001	0,64 \pm 0,04	0,97	0,28 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01
Sr	88,4 \pm 1,72 a	96,6 \pm 0,01	381,9 \pm 6,1 b	241,1 \pm 6,29	186,2 \pm 0,99	185,7 \pm 0,7
Ti	0,021 \pm 0,019 a	0,13 a	0,19 \pm 0,09 a	1,92 \pm 0,14 b	0,15 \pm 0,10 a	0,13 \pm 0,02 a
U	0,48 \pm 0,007 a	0,50 \pm 0,004	1,05 \pm 0,03 b	0,85 \pm 0,05	0,60 \pm 0,005	0,57 \pm 0,001
V	0,50 \pm 0,02 a	0,53 \pm 0,03	1,06 \pm 0,08 b	2,74 \pm 0,07 b	0,62 \pm 0,02	0,59 \pm 0,007
Zn	3,57 \pm 0,62 a	9,81 \pm 3,62	568,6 \pm 12,5 b	40,4 \pm 16,9	30,0 \pm 4,53	40,3 \pm 20,1
K	0,33 \pm 0,003 a	0,36 \pm 0,004	2,25 \pm 0,03 b	9,07 \pm 0,49 b	0,65 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02
Mg	11,6 \pm 0,13 a	10,3 \pm 0,45 b	15,9 \pm 0,13 c	13,1 \pm 0,01 e	11,1 \pm 0,18 d	11,1 \pm 0,19 d
Na	2,11 \pm 0,07 a	2,27 \pm 0,02	5,27 \pm 0,05 b	110,3 \pm 0,39 b	3,18 \pm 0,08	2,74 \pm 0,42

4. REZULTATI

4.4. Biometrijski pokazatelji jedinki potočne pastrve

Na obje postaje uzorkovanja su ulovljene 22 jedinke potočne pastrve kojima su određeni osnovni biometrijski pokazatelji (Tablica 4). Kao što se vidi, ni jedan od pokazatelja nije statistički značajno različit među postajama, iako je ukupna dužina i masa jedinki neznatno povišena u riba koje obitavaju u rijeci Krki uz grad Knin. Ne postoji značajna razlika ni među hepatosomatskim, gonadosomatskim i kondicijskim indeksom. U dijelu toka uz grad Knin je ulovljeno više ženki, dok je omjer među spolovima izjednačen u jedinki ulovljenih kod izvora rijeke Krke. S obzirom na velik broj mjerenih bioloških parametara, nisu u svim jedinkama provedene sve analize, već je svaki biomarker i citosolski metali određen u duplikatu u 12 jedinki sa svake postaje.

Tablica 4. Biometrijski parametri jedinki potočne pastrve (*Salmo trutta*) uzorkovanih na 2 postaje u rijeci Krki tijekom 2015. godine u proljetnom periodu (srednja vrijednost \pm SD i raspon)

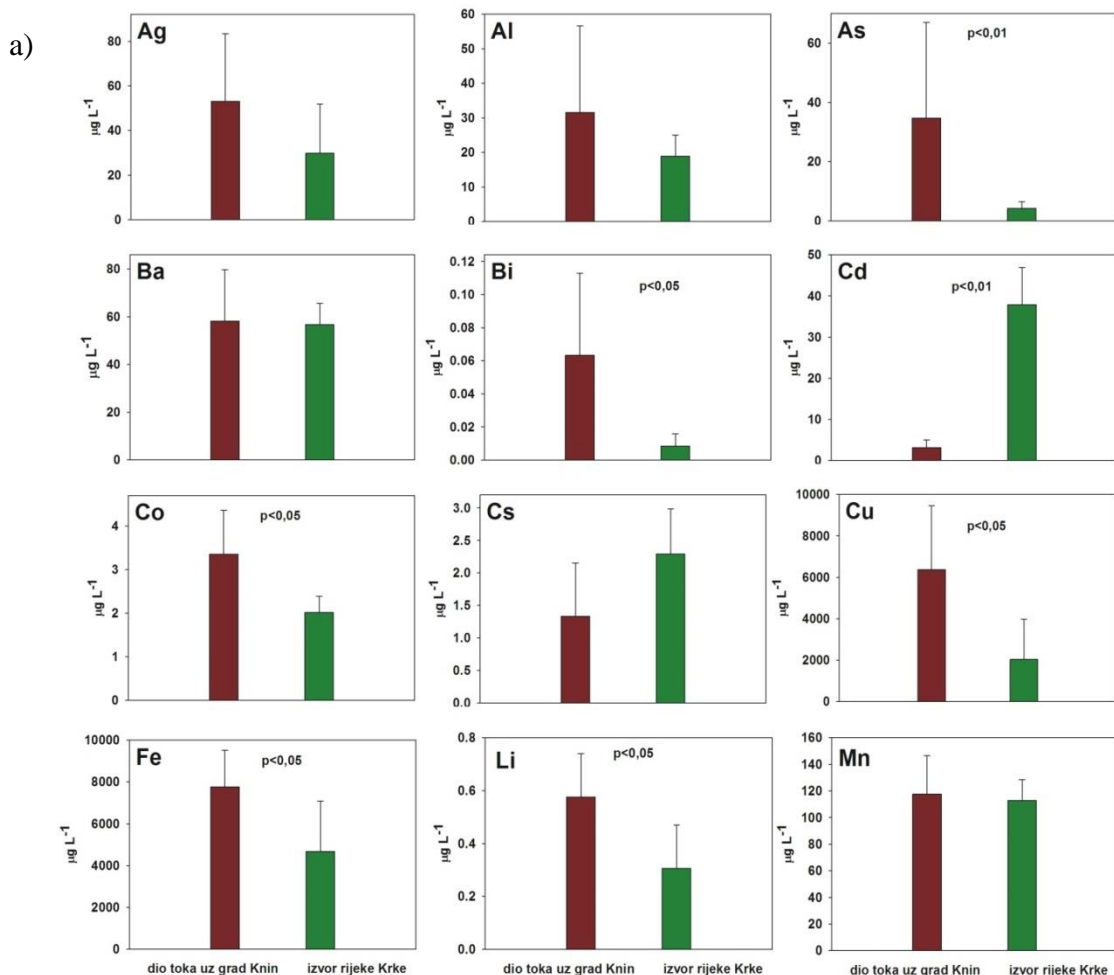
Biometrijski parametri		Izvor rijeke Krke n=22	Dio toka rijeke Krke uz grad Knin (od Orašnice do ušća Butižnice) n=22
Ukupna dužina (cm)		19,1 \pm 4,8 (12,0 - 30,5)	21,9 \pm 12,7 (10,5 - 58,0)
Ukupna masa (g)		98,5 \pm 80,9 (23,6 - 350,2)	268,1 \pm 542,0 (12,6 - 1870,0)
Masa jetre (g)		1,4 \pm 1,5 (0,27 - 5,28)	3,5 \pm 8,0 (0,14 - 33,80)
Masa gonada (g)		0,4 \pm 0,3 (0,04 - 1,10)	0,8 \pm 1,8 (0,02 - 6,54)
Spol	♀	11	14
	♂	11	6
	ND	/	2
Gonadosomatski indeks/ %		0,4 \pm 0,3 (0,1 - 1,0)	0,2 \pm 0,1 (0,03 - 0,45)
Hepatosomatski indeks / %		1,3 \pm 0,5 (0,4 - 2,7)	1,2 \pm 0,6 (0,9 - 3,5)
Kondicijski indeks/ g cm ⁻³		1,2 \pm 0,3 (0,9 - 2,6)	1,1 \pm 0,2 (0,2 - 1,4)

ND – nije bilo moguće determinirati spol

4. REZULTATI

4.5. Koncentracije metala u citosolu jetre potodne pastrve

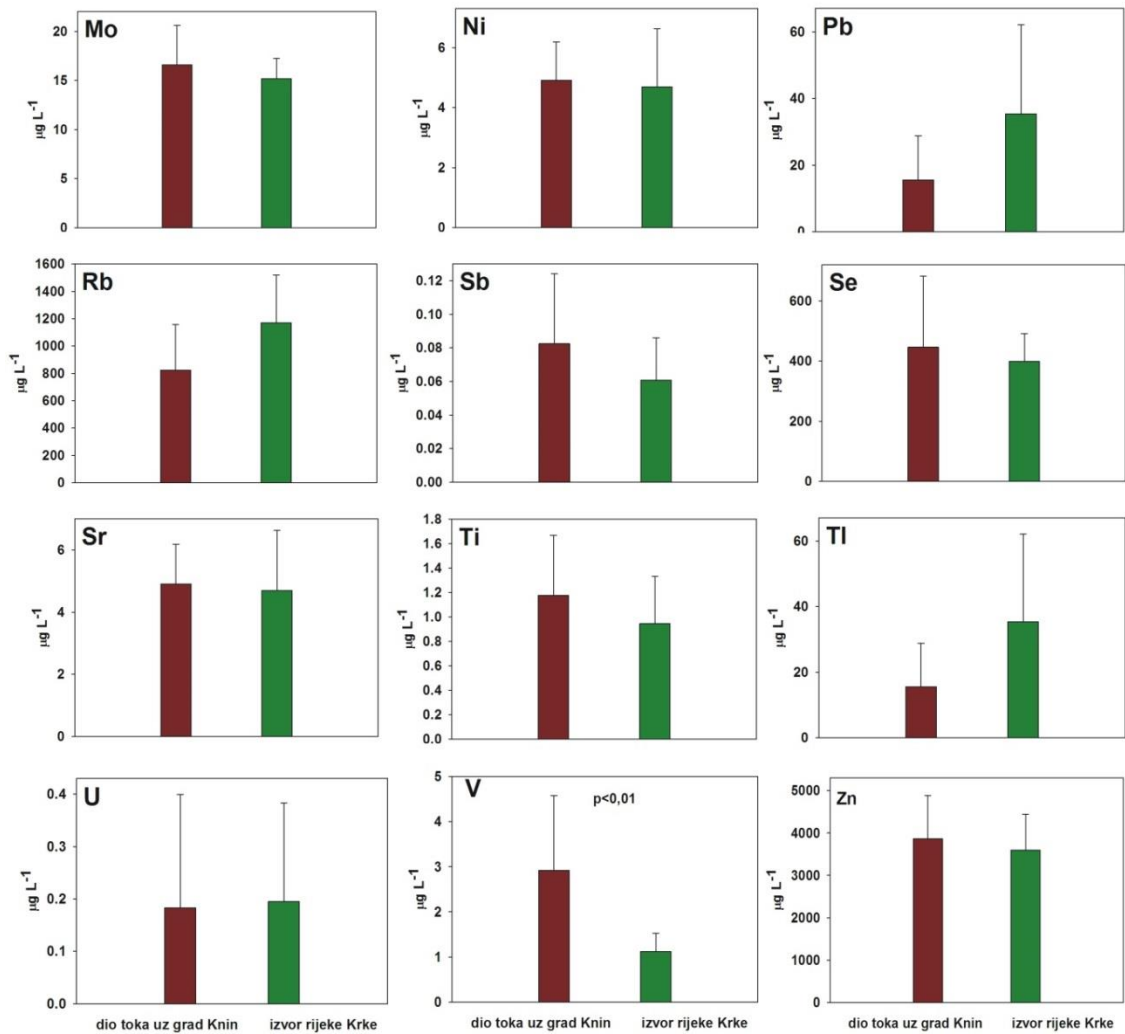
Kao biološki pokazatelji raspoložive koncentracije metala u organizmu određeni su citosolski metali u jetri riba. Na Slici 14 se vidi da je većina metala povišena u jetri riba koje obitavaju u području rijeke Krke uz grad Knin, odnosno Se, Mo, Zn, Ag, Sb, Al, Ti, Mn, Ni, Sr i Ba, a statistički značajno Li, Bi, Co, V, Fe, Cu i As u odnosu na izvor. Uočene su i povišene vrijednosti Pb, Tl, Cs, Mo i U u riba ulovljenih na izvoru rijeke Krke, u kojih je Cd i statistički značajno povišen. Od makroelemenata Na je neznatno povišen u riba ulovljenih uz grad Knin, a Mg i K u riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke. Usporedbom s koncentracijama metala u vodi, isti trend porasta metala u vodi i citosolu jetre riba nađen je za Al, As, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Na, Ni, Sb, Se, Sr, Ti, U, V i Zn.



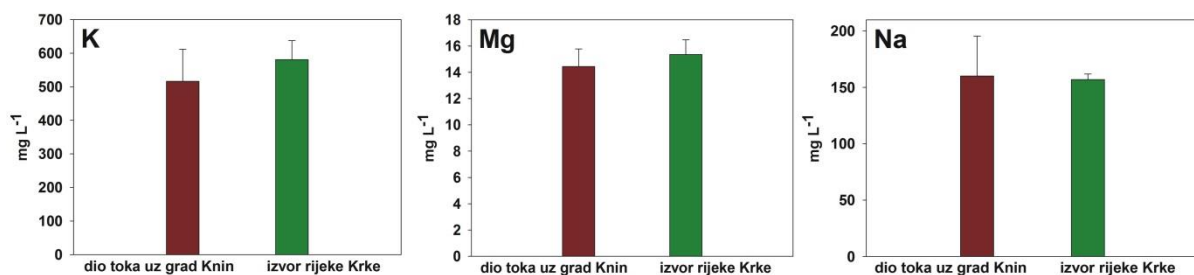
Slika 14 Koncentracije mikroelemenata izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potodne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina: a) Ag, Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Li, Mn. Istaknuta je statistički značajna razlika među postajama (t-test)

4. REZULTATI

b)



Nastavak Slike 14 b) Mo, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, U, V, Zn. Istaknuta je statistički značajna razlika među postajama (t- test)



Slika 15 Koncentracije makroelemenata K, Mg i Na izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potučne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina

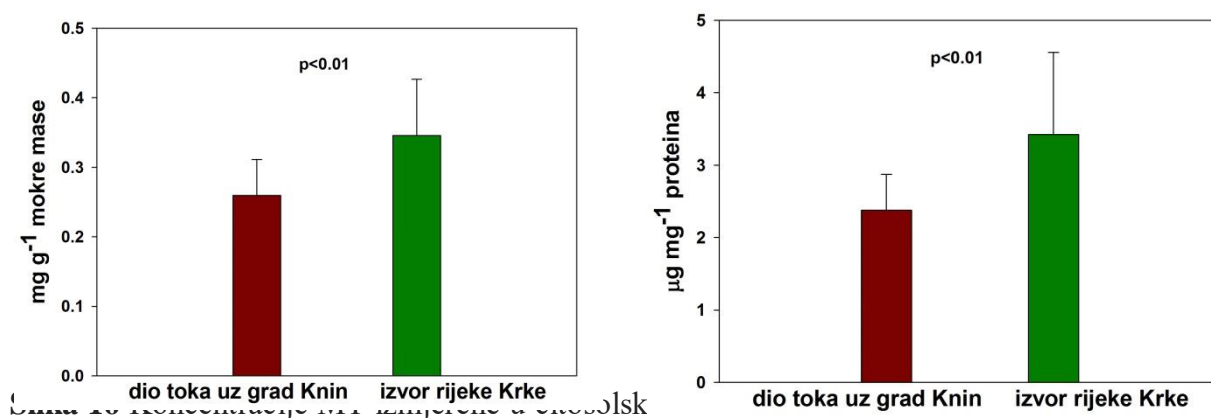
4. REZULTATI

4.6. Biomarkeri

Biološki odgovor organizma na antropogene utjecaje u rijeci Krki praćen je i usporedbom vrijednosti biomarkera, kao ranih promjena na razini stanice koje pravovremeno mogu ukazati da je organizam pod utjecajem onečišćenja i stresora iz okoliša. U jetri riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke te u dijelu toka uz grad Knin su određeni MT kao biomarkeri izloženosti metalima, MDA kao biomarker oksidativnog stresa te ukupni citosolski protein kao biomarkeri općeg stresa.

4.6.1. Koncentracije metalotioneina

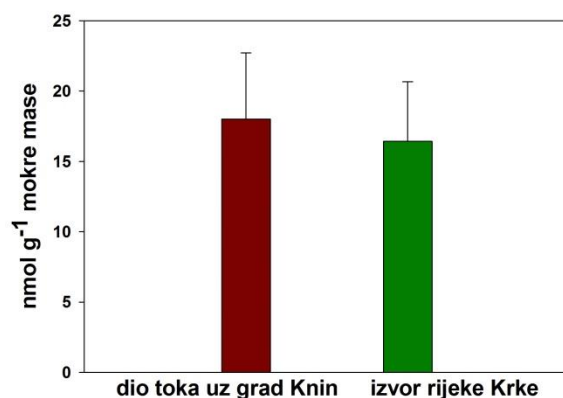
Koncentracije MT izmjerene u citosolskoj frakciji jetre potočne pastrve su statistički značajno povišene u riba ulovljenih uz izvor rijeke Krke. S obzirom da MT možemo izraziti kao mg g^{-1} mokre mase jetre, a ako se podijele s koncentracijama citosolskih proteina onda i kao $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteina, na Slici 16 je očigledno da u oba slučaja postoji statistički značajna razlika koja ukazuje na eventualnu izloženost metalima u riba ulovljenih na izvoru rijeke Krke.



izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina. Istaknuta je statistički značajna razlika među postajama (t-test)

4.6.2. Koncentracije malondialdehida

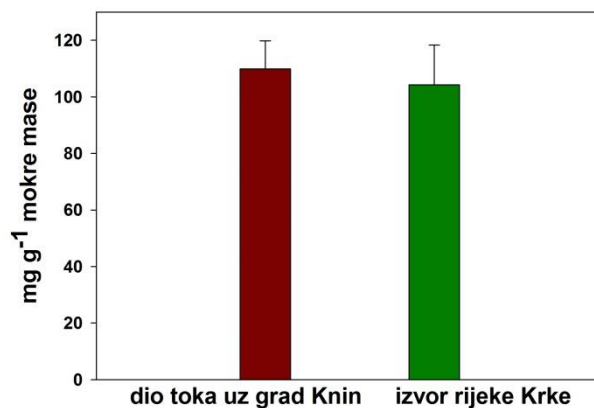
Koncentracije MDA ukazuju na utjecaj oksidativnog stresa na organizme, koji mogu izazvati i metali i organska zagađivala. Na Slici 17 se vidi da su koncentracije MDA povišene u riba koje obitavaju u području rijeke Krke uz grad Knin, ali ne statistički značajno.



Slika 17 Koncentracije MDA izmjerene u jetri potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina

4.6.3. Koncentracije ukupnih citosolskih proteina

Ukupni citosolski proteini pokazuju isti trend kao i MDA, odnosno povišene vrijednosti u riba koje obitavaju u rijeci Krki u dijelu toka uz točkaste izvore zagađenja grada Knina (Slika 18). Kao i MDA, pod utjecajem su ne samo anorganskih, već i organskih zagađivala te mogu ukazivati na opće stanje organizma.



Slika 18 Koncentracije ukupnih citosolskih proteina izmjerene u jetri potočne pastrve ulovljene na izvoru rijeke Krke te dijelu toka uz antropogene utjecaje grada Knina

5. RASPRAVA

Voda je prijeko potrebna za opstanak svih živih organizama, kao i za tehničko – tehnološki razvoj čovječanstva. Osim dovoljne količine vode za vodoopskrbu pučanstva, od iznimne je važnosti njezina kakvoća. To je posebno važno za zaštićene prirodne fenomene, u kojima je kroz sustavno praćenje stanja okoliša prioritet očuvanje vodenih staništa te raznolikosti biljnih i životinjskih vrsta, a jedan od njih u Republici Hrvatskoj je Nacionalni park Krka. S obzirom na postojanje izvora zagađenja na dijelu vodotoka rijeke Krke uz grad Knin, smještenog samo 2 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka, kao i činjenicu da do sada nije provedena sveobuhvatna procjena onečišćenja i utjecaja na ovaj riječni ekosustav, provedeni monitoring je obuhvaćao procjenu kakvoće vode primjenom fizikalno-kemijskih i mikrobioloških čimbenika te procjene utjecaja na biotu koja tu obitava određivanjem biomarkera, jer predstavljaju promjene na razini stanice koje su rani pokazatelji izloženosti zagađivalima.

U ovom istraživanju je uz navedene čimbenike procjene kakvoće vode posebna pažnja posvećena i metalima te su izmjerene koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi, kao i u citosolu jetre potočne pastrve, u svrhu određivanja bioraspoloživih koncentracija u organizmu, što predstavlja novi pristup procjene izloženosti metalima u ekostoksikologiji.

5.1. Procjena kakvoće vode s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike

Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 89/2010) izvor rijeke Krke je s obzirom na sve izmjerene fizikalno-kemijske čimbenike kategoriziran kao voda vrlo dobrog ekološkog stanja, dok se kakvoća vode u području točkastih izvora zagađenja grada Knina pogoršava, od II. do V. kategorije, ovisno o čimbeniku (Tablica 1).

5.1.1. Temperatura vode

Temperatura predstavlja jedan od najvažnijih abiotičkih čimbenika u akvatičkim ekosustavima. Zbog povezanosti s ostalim parametrima poput gustoće ili koncentracije otopljenog kisika, ona indirektno utječe i na disanje, metabolizam i ponašanje živih organizama (brzina disanja, razmnožavanje, kretanje, probave hrane, preobrazbi i dr.) u vodi. S obzirom da većina organizama koji žive u vodenim okolišima nema sposobnost samoregulacije tjelesne temperature (poikilotermni organizmi) temperatura vode uvjetuje i

5. RASPRAVA

njihovu rasprostranjenost (GLOBE, 2003). Zbog navedenih razloga vrlo je važno kontinuirano praćenje temperaturnih vrijednosti na vodenim staništima (Pawar i Shembekar, 2012).

Izmjerena temperatura u rijeci Krki ne ukazuje na odstupanje od prosjeka. Na izvoru su zabilježene nešto niže vrijednosti jer je riječ o rijeci ponornici koja prolaskom kroz podzemlje nije u doticaju sa sunčevim zračenjem zbog čega joj je temperatura približno jednaka tokom cijele godine. Nizvodno, uz grad Knin, temperatura raste za nekoliko stupnjeva. Korito se širi i postaje pliće nego na izvoru te je zbog toga voda podložnija zagrijavanju insolacijom, ali svakako postoji i mogućnost zagrijavanja pod utjecajem otpadnih komunalnih voda, koje su uzorkovale porast temperature od oko 4 °C u trenutku ispuštanja otpadnih voda u odnosu na izvor i područje prema Butižnici, smješteno nizvodno od utjecaja onečišćenja (Tablica 1).

5.1.2. Zamućenje vode

Zamućenje je svojstvo koje opisuje prisutnost suspendiranih ili koloidalnih tvari u otopini, a može ukazivati i na prisustvo mikroorganizama. Mjerenja zamućenja iznimno su važna u nadzoru kakvoće pitke vode, kao i otpadnih i industrijskih voda. Naši rezultati upućuju na porast zamućenja vode u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin, što je dokaz povećanja suspendiranih tvari i mikroorganizama u vodi, koje se očigledno unose otpadnim vodama koje se prethodno adekvatno ne pročišćavaju. To je dokazano i porastom zamućenja na 11 FAU prilikom otpuštanja otpadnih komunalnih voda u odnosu na uobičajenih 2-3 FAU uz grad Knin, odnosno 0 FAU na izvoru rijeke Krke (Tablica 1). Posljedica zamućenja može smanjiti prodiranje svjetlosti u vodu te onemogućiti rast i razvoj algi i podvodnog višeg bilja, kao i ometati dezinfekciju te obezbijediti sredinu za rast mikroba (GLOBE, 2003).

5.1.3. pH i oksido-redukcijski potencijal

Mjera za kiselost otopine je pH vrijednost koja se izražava kao aktivitet vodikovih iona (H^+) u nekoj otopini. Ovisno o koncentraciji H^+ i OH^- otopina može biti kisela, lužnata ili neutralna. Ako su oba iona zastupljena u jednakim koncentracijama pH je jednak 7, odnosno otopina je neutralna. Takav slučaj je rijedak u prirodi jer je ravnoteža u vodi narušena prilikom otapanja različitih supstanci (npr. otapanje soli koje su sastavni dio stijena ili plinova iz zraka), stoga se većina kopnenih voda dijeli na dva osnovna tipa: vode s neutralno-alkaličnom

5. RASPRAVA

reakcijom i vode s kiselim reakcijom. Neutralno-alkalične vode su one u kojima je pH vrijednost rijetko ispod 6, a u nizu slučajeva zna biti iznad 10, dok su vode s kiselim reakcijom one s pH nižim od 5 (Piria i Tomljanović, 2006). Prema navedenoj podjeli, vode rijeke Krke pripadaju neutralno-alkaličnim vodama. Na svim postajama pH vrijednosti kreću se oko 8 (Tablica 1), što je tipično za krške rijeke bogate kalcijevim i magnezijevim karbonatom te imaju pH vrlo sličan morskom. Izmjerene pH vrijednosti u vodi rijeke Krke su optimalne za učinkovitu biološku produktivnost. Lagani pad pH zamjećuje se prilikom ispusta komunalnog otpada što ukazuje na organsko zagađenje, povišene koncentracije hranjivih soli, kao i fekalnih i heterotrofnih bakterija, međutim prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 89/2010) zabilježeni pad pH vrijednosti ne dovodi do pogoršanja ekološkog stanja vode.

Oksido-redukcijski potencijal vode rijeke Krke je negativan i ima uobičajene vrijednosti za slatkovodne ekosustave na svim postajama (Tablica 1). Negativan ORP je tipičan za izvorske vode i ukazuje da se radi o reduciranoj vodi bogatoj elektronima.

5.1.4. Alkalitet

Alkalitet predstavlja sposobnost vode da neutralizira kiselinu, a određen je koncentracijama karbonatnih (CO_3^{2-}) i bikarbonatnih (HCO_3^-) iona koji neutraliziraju vodikove ione (H^+), kao i ionima koji mogu biti prisutni u nižim koncentracijama poput silikata, amonijaka i fosfata. Što je alkalitet vode veći, to je veći kapacitet vode za neutralizacijom kiseline. U vodu kiseline dolaze padalinama i rjeđe kroz tlo (GLOBE, 2003).

U rijeci Krki zabilježen je izrazito nizak alkalitet (Tablica 1), što potvrđuje osjetljivost ovog ekosustava, kao i činjenicu da je potrebno sustavno praćenje ekološkog stanja rijeke Krke .

5.1.5. Ukupno otopljene soli i vodljivost

Vodljivost ovisi o količini otopljenih iona u vodi te se određivanjem vodljivosti indirektno određuje i količina otopljenih tvari u vodi, odnosno otopljenih anorganskih soli. Glavninu soli čine kationi Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ te anioni karbonata, hidrogenkarbonata, klorida, sulfata i nitrata (GLOBE, 2003). Obzirom da otopljene čestice mogu direktno utjecati

5. RASPRAVA

na električnu vodljivost vode, vrijednosti ova dva parametra međusobno su proporcionalne što se može uočiti i u dobivenim rezultatima. Najviša vodljivost uočena je pri ispuštanju otpadnih komunalnih voda zbog unosa velike količine otopljenih čestica u vodu, što se odražava i na povišeni TDS i dovodi do pogoršanja kakvoće vode do jako loše. Povišenje je zabilježeno i na području ispusta otpadnih tehnoloških voda tvornice vijaka DIV d.o.o., gdje je kakvoća vode ipak manje pogoršana, odnosno spada u kategoriju II. (dobro ekološko stanje) (Tablica 1).

5.1.6. Otopljeni ugljični dioksid, karbonatna i ukupna tvrdoća vode

Voda se obogaćuje ugljičnim dioksidom iz dva razloga, kontaktom s atmosferom koja sadrži CO₂ (0,0388 %) te prolaskom kroz humusno tlo koje je bogato CO₂. Sadržaj CO₂ je presudan za karbonatnu ravnotežu u vodi te su karbonatna tvrdoća i CO₂ usko povezani. Tvrdoća vode je svojstvo vode koje nam govori o količini minerala sadržanih u vodi. Ukupna tvrdoća vode predstavlja zbroj svih karbonatnih, sulfatnih, kloridnih, nitritnih i fosfatnih aniona vezanih na zemnoalkalijske metale (Ca²⁺, Mg²⁺), dok karbonatna tvrdoća predstavlja sadržaj Ca²⁺ i Mg²⁺ iona koji su u ravnoteži sa HCO₃⁻ ionima (URL 2). Vode se prema tvrdoći mogu podijeliti na meke, lagano tvrde, umjereno tvrde, tvrde i jako tvrde vode (URL 3). Prema toj podjeli rijeka Krka pripada kategoriji umjereno tvrdih voda jer joj se tvrdoća kreće u rasponu od 8-18 °dH (Tablica 1). Krške rijeke su općenito karakterizirane nižom tvrdoćom s obzirom da brzo protječu kroz dobro topive karbonatne stijene u usporedbi s rijekama kod kojih se voda dugo vrijeme zadržava u karbonatnim aluvijalnim tlima čija je tvrdoća jako velika. Također u skladu s rezultatima, krške rijeke sadrže malo otopljenog CO₂ (Tablica 1).

5.1.7. Režim kisika

Kisik u vodi nastaje kao produkt fotosinteze vodenih algi i bilja, ali također može dospjeti i otapanjem atmosferskog kisika s obzirom da se u zraku nalazi oko 25 % više kisika nego u vodi. Zasićenost kisikom je relativna mjera koja se izražava u postocima i označava udio otopljenog kisika u vodi u odnosu na normalnu topljivost pri određenoj temperaturi.

Krka je brzotekuća i turbulentna rijeka te je na svim njenim postajama, osim prilikom ispusta komunalnog otpada, zabilježena velika zasićenost kisikom (Tablica 1). Veliki unos organskog materijala (kanalizacije) može drastično smanjiti zasićenost kisika, što ukazuje na

5. RASPRAVA

zagađenost vodenog ekosustava kao što je slučaj i na rijeci Krki. Iz Tablice 1 je očigledan pad kakvoće vode tijekom otpuštanja komunalnih otpadnih voda do jako lošeg ekološkog stanja (V. kategorija). Otopljeni kisik koriste za disanje mnoge vodene životinje te je važno napomenuti da bez dovoljne količine kisika život u vodi nije moguć za većinu biljnih i životinjskih vrsta (GLOBE, 2003). Za normalan život riba koncentracija kisika mora biti u rasponu od 8 do 15 mg O₂ L⁻¹, a ispod 3 mg L⁻¹ je opasna za većinu vodenih organizama. Dobiveni rezultati ukazuju da je prilikom otpuštanja komunalnih otpadnih voda ugrožen normalan metabolizam organizama rijeke Krke jer je izmjerena koncentracija 0,13 mg O₂ L⁻¹ (Tablica 1).

Organska tvar koja se prirodno nalazi u vodi (mrtvi biljni i životinjski organizmi), a pogotovo dodatni antropogeni unos (npr. kanalizacija) povećava potrošnju kisika prilikom procesa razgradnje. Rezultati KPK u rijeci Krki ukazuju na pogoršanje ekološkog stanja vode na svim postajama u odnosu na izvor i to na vrlo loše stanje vode (V. kategorija, Tablica 1) te potvrđuju značajan antropogeni utjecaj na kakvoću vode rijeke Krke.

5.1.8. Hranjive tvari

Povećan unos hranjivih tvari može dovesti do eutrofikacije, a time i pogoršanja kakvoće vode. Prisutnost velikih količina nitrita u ispitivanoj vodi ukazuje na svježije zagađenje organskim tvarima. Prirodni izvori povećanja koncentracije nitrata u vodi su kiša, snijeg, magla ili raspad organske tvari u tlu i sedimentu, dok su antropogeni izvori primjena umjetnih gnojiva u poljoprivredi (GLOBE, 2003). Prirodne vode sadrže fosfor u vrlo niskim koncentracijama. Povećanje sadržaja fosfora može prouzročiti niz neželjenih zbivanja (cvjetanje algi, sniženje sadržaja otopljenog kisika, pomor nekih vrsta riba). Izvori fosfora u vodama mogu biti prirodnog i antropogenog porijekla, a uglavnom su posljedica onečišćenja komunalnim otpadnim vodama. Amonijak, koji u vodi nastaje kao produkt raspadanja organskih tvari je veoma jak otrov koji djeluje na centralni živčani sustav kod svih vrsta riba (Piria i Tomljanović, 2006).

U rijeci Krki se, prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 89/2010), pogoršava kakvoća vode uz grad Knin na dobro do jako loše ekološko stanje (II.-V. kategorija) na temelju koncentracija izmjerenih hranjivih tvari (Tablica 1). S obzirom na ukupni dušik,

5. RASPRAVA

fosfor, nitrate i nitrite, jako loše ekološko stanje vode je zabilježeno prilikom izlivanja komunalnih otpadnih voda. Za navedene je čimbenike jednaka situacija i kad se ne ispuštaju otpadne vode na postajama oko grada Knina (V. kategorija), s izuzetkom nitrata, za koje je voda od II. do IV. kategorije. Amonij također utječe na pogoršanje kakvoće vode te je u području grada Knina voda rijeke Krke od II. do III. kategorije (Tablica 1).

Važno je naglasiti da većina izmjerenih fizikalno-kemijskih čimbenika na postaji prema ušću rijeke Butižnice, koja nije pod direktnim antropogenim utjecajem grada Knina, ima usporedive vrijednosti ili ekološki status kao na izvoru rijeke Krke. Izuzetak su KPK i hranjive soli, koje ukazuju na zagađenja i nizvodno od grada Knina (Tablica 1), a time i potencijalnu opasnost za NP Krka. Rezultat ekološkog stanja vode rijeke Krke u ovom istraživanju je upozorenje na kontinuiranu izloženost ovog dijela toka otpadnim vodama koje narušavaju njezinu kakvoću vode te potreba za sustavnim praćenjem stanja vode rijeke Krke.

5.2. Procjena kakvoće vode s obzirom na mikrobiološke čimbenike

Osnova propisanih metoda za određivanje mikrobiološke ispravnosti vode je utvrđivanje njene fekalne kontaminacije. Izmet sadrži veliki broj mikroorganizama koji sačinjavaju normalnu floru digestivnog trakta, tako se *E. coli* i enterokoki nalaze u izmetu 94- 100 % analiziranih uzoraka (Tallon i sur., 2005). Nalaz ovih mikroorganizama u vodi je znak fekalne kontaminacije i ukazuje na mogućnost prisustva i patogenih crijevnih mikroorganizama u vodi, što predstavlja opasnost po ljudsko zdravlje. Primarni indikatori fekalne kontaminacije voda su *E. coli* i enterokoki (Ashbolt i sur., 2001). Također, postoje i ostali potencijalni pokazatelji fekalnog onečišćenja poput koliformnih bakterija: *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Citrobacter* (KEC koliformi) (Tallon i sur., 2005).

U vodi rijeke Krke uz grad Knin očigledan je porast svih očitanih skupina bakterija, a njihov broj je posebno povećan u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda, čime je dokazan direktan unos fekalnog zagađenja u rijeku Krku (Tablica 2). S obzirom da u važećoj Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 89/2010) ne postoji mikrobiološka kategorizacija vode, raspravu temeljimo na Uredbi o klasifikaciji voda (NN 137/2008) iz koje je vidljivo da je voda na izvore rijeke Krke I. kategorije s obzirom na mikrobiološke čimbenike. Uz komunalni ispušt i u trenutku otpuštanja komunalnih otpadnih voda je rijeka Krka najlošije kakvoće,

odnosno V. kategorije. U području rijeke Orašnice uz “kninsku crnu jamu” je kakvoća vode II.-III. kategorije, a nizvodno od utjecaja oncečišćenja prema rijeci Butižnici opet I. (*E. coli* i enterokoki) i II. (koliformi i ukupan broj bakterija) kategorije (Tablica 2). Ovakvi podaci potvrđuju očigledan unos bakterija, posebno komunalnim otpadnim vodama, koje pogoršavaju mikrobiološku kakvoću vode uz grad Knin i dovode do jako lošeg ekološkog stanja.

5.3. Koncentracije ukupno otopljenih metala u vodi rijeke Krke

Biogeokemijski procesi u vodenom okolišu su konstantni te su stoga rijeke i jezera stalno izloženi promjenama. Razine metala u tragovima u vodenom okolišu ovise o pritocima, podzemnom dotoku vode, dotoku industrijskih otpadnih voda, otpadnih voda iz domaćinstva te urbanih otpadnih voda. Također, ovise o vrsti stijena i tla u rijeci (Omanović i sur., 2007). Zbog specifičnih karakteristika krškog područja (geomorfologija, hidrologija), izvor zagađenja može svoj utjecaj ispoljiti tek kilometrima dalje putem podzemnih tokova (Cukrov, 2008). Stoga ovo može otežati interpretaciju dobivenih rezultata mjerenja teških metala u krškim rijekama. Nakon što su uneseni u vodeni okoliš, metali u tragovima mogu biti prisutni u otopljenom ili partikularnom obliku te se akumulirati u sedimentu ili biti uneseni u vodene organizme. Iako sediment djeluje kao mjesto akumulacije metala u tragovima, razni biogeokemijski procesi mogu dovesti do njihove remobilizacije u vodeni stupac te tako značajno povisiti njihovu koncentraciju do toksične razine za vodene organizme (Fichet i sur., 1998).

Povišene koncentracije metala u tragovima mogu imati različite toksične učinke na živa bića unutar vodenog ekosustava, a samim time i na čovjeka (Cukrov, 2008). Neki metali poput Cd, Hg i Pb imaju toksični učinak pri vrlo niskim koncentracijama. Stoga su koncentracije metala u tragovima vrlo bitan parametar za ocjenu stanja kakvoće prirodnih voda (Branica, 1990). S obzirom da koncentracije metala u vodenom okolišu jako ovise o području u kojem se nalaze, za svako karakteristično područje potrebno je odrediti prirodnu razinu metala u tragovima. Općenito, raspon prirodnih koncentracija metala u tragovima kreće se od nekoliko mikrograma do manje od 1 nanograma po litri (Cukrov, 2008). U krškim rijekama u Hrvatskoj metali su prirodno prisutni u jako niskim koncentracijama pa i nakon malog dotoka antropogenog zagađenja dolazi do naglog povećanja koncentracije metala.

5. RASPRAVA

Naši rezultati ukazuju na povišenje koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda u odnosu na druge postaje, i to za 19 metala od ukupno 24 izmjerena. Koncentracija pojedinih metala zabilježena u trenutku ispuštanja komunalnih otpadnih voda je veća u odnosu na izvor: skoro 7000x za Mn, 50-100x za Na, Co i Ti, 10-30x za As, Ba, Al, Li i K te 3-7x za Cd, V i Mo (Tablica 3). Nepročišćene komunalne vode bogate organskim česticama služe kao nosači metala tj. partikularne čestice iz otpadnih voda doprinose adsorpciji metala. Kada smo izuzeli vrijednosti izmjerene u trenutku otpuštanja komunalnih otpadnih voda i usporedili koncentracije metala među postajama, u svih izmjerenih metala zabilježene su najviše koncentracije u dijelu toka uz „kninsku crnu jamu“, izuzev Cu čije su vrijednosti najviše uz komunalni ispušt. Izmjerene koncentracije metala na postaji kod tvornice vijaka u usporedbi s izvorom rijeke Krke su više: 4000x za Mn, 150-200x za Zn i Fe, 50-70x za Co i Ni, 7-9x za K, T i Li, 3-4x za Pb, Rb, Sb, Na, Se, Sr i Mo te 2x veće za Al, As, U, V, Ba, Cd i Be (Tablica 3). Poznato je da se vijci najčešće proizvode od čelika (legura Fe s C) i mjedi (legura Cu i Zn) čije legure mogu sadržavati i manje količine drugih metala. U čelične legure se često dodaje Ni i V koji daju svojstvo još veće otpornosti materijala te se na površinu nanosi i Ti kako bi se spriječila korozija, dok se u mjedene legure dodaje Fe, Mn, Ni, Al i Si (Lositskii i sur., 1966). Povećanje koncentracije Li u okolišu često se može vezati uz metalurgiju, odnosno uz proizvodnju metalnih legura te uz tvornice zbog korištenja maziva za podmazivanje strojeva koji se rade na bazi Li (Lu i sur., 2011), što sve skupa ukazuje na tvornicu vijaka kao točkasti izvor unosa metala, što je potvrdio i porast izmjerenih koncentracija metala u vodi rijeke Krke uz tvornicu vijaka.

Cukrov i sur. (2007) su istraživali prostornu i vremensku raspodjelu Cd, Cu, Pb, Zn i Hg u rijeci Krki te su na postaji nizvodno od Knina zabilježili povećanu koncentraciju Zn, Pb i Hg i povezali je s antropogenim utjecajem ispusta otpadnih voda na tom području. Značajan porast metala u tragovima (Zn, Cd, Pb i Cu) potvrđen je nizvodno od grada Knina i u istraživanju koje su proveli Cukrov i sur. 2008. godine, kada su zabilježene povišene koncentracije metala u odnosu na izvor rijeke Krke 60x za Zn, 25x za Pb, 4x za Cu i 2x za Cd.

Vrijednosti izmjerene nizvodno od ulijevanja otpadnih voda, na dijelu toka rijeke Krke prije ušća Butižnice, su za sve metale niže u odnosu na postaju uz antropogene utjecaje grada Knina. Razlog tome je sposobnost samopročišćavanja rijeke Krke, koju su opisali Cukrov i

5. RASPRAVA

sur. (2008). Naime, proces samopročišćavanja moguć je zbog intenzivne sedimentacije u rijeci Krki te utoka podzemnih voda. Nizvodnije, područje sedrenih barijera i širokih jezera djeluje kao prirodna „zamka“ gdje se talože metali te je i Cukrov (2008.) zabilježio pad ukupnih koncentracija metala u tragovima na razinu koja je prisutna na izvoru rijeke Krke (posebno za Zn i Pb). U našem istraživanju ovaj proces dokazuju i vrijednosti As, Ba, Be, Cd, Cu, Mo, Pb, Rb, Sb, Se, U, V, K, Mg i Na izmjerene prije ušća Butižnice, koje su usporedive s koncentracijama navedenih metala na izvoru rijeke Krke (Tablica 3).

Dobiveni podaci ukazuju na jasan trend porasta koncentracija metala od izvora prema točkastim izvorima zagađenja grada Knina, odnosno ispustu tehnoloških otpadnih voda tvornice vijaka DIV d.o.o. te gradskom ispustu komunalnih otpadnih voda, a razlog tako snažnog utjecaja otpadnih voda je nepostojanje adekvatnih uređaja za pročišćavanje. Uzevši u obzir podatke o metalima u tragovima, tok Krke može se podijeliti na izvorišni dio- gdje su koncentracije metala niske, dio uz grad Knin- gdje su koncentracije značajno povišene te na dio toka nizvodno od Knina, a prije ušća rijeke Butižnice- gdje opadaju koncentracije većine metala zbog procesa samopročišćavanja.

5.4. Biološke promjene u potočnoj pastrvi

Kao indikatorski organizam za praćenje utjecaja zagađivala u riječnom ekosustavu su izabrane ribe. Kako su na vrhu hranidbenog lanca ribe su česti indikatorski organizmi, a pogodne su i kao kralješnjaci zbog slične fiziologije sa sisavcima (Catsiki i Strogyloudi, 1999). Ribe su također blisko povezane s okolišem u kojem žive jer im tjelesna temperatura ovisi o temperaturi okolišne vode. Time je i fiziologija i imunologija riba pod utjecajem temperaturnih promjena te uspješno reflektiraju uvjete staništa u kojem žive (Lamková i sur., 2007). Toksični učinak metala u riba dovodi do oštećenja unutrašnjih organa, promjena krvnih parametara, slabljenja imunološkog sustava, što sve rezultira smanjenom sposobnosti prilagodbe, vitalnosti i otpornosti na bolesti (Staniskienu i sur., 2006).

Biometrijski parametri riba s dviju uzorkovanih postaja (izvor rijeke Krke i dio toka pod antropogenim utjecajima uz grad Knin) se statistički značajno ne razlikuju, kao ni izračunati hepatosomatski, gonadosomatski i kondicijski indeks (Tablica 4), što je vrlo važno jer ne utječu na vrijednosti citosolskih metala i biomarkera. Već je dokazano kako razlika u

masi, reproduktivnom stadiju, starosti riba može doprinijeti razlikama u biološkom odgovoru organizma te je vrlo važno razlučiti biološke promjene uzrokovane biotičkim čimbenicima od antropogenih utjecaja (Filipović Marijić i Raspor, 2010, 2012, 2014).

5.4.1. Koncentracije metala u citosolu jetre potočne pastrve

Povišene koncentracije većine metala uočene su u citosolu riba ulovljenih na području točkastih izvora zagađenja kod grada Knina u odnosu na ribe ulovljene kod izvora rijeke Krke. Porast koncentracija Se, Mo, Zn, Ag, Sb, Al, Ti, Mn, Ni, Na, Sr i Ba te značajan porast Li, Bi, Co, V, Fe, Cu i As (Slike 14 i 15) vjerojatno je posljedica kontinuirane izloženosti metalima ispuštanjem tehnoloških otpadnih voda bez prethodnog pročišćavanja. Poznato je da toksični učinak metala ovisi o koncentraciji biološki dostupnih oblika metala. Upravo je zato prednost određivanja metala u citosolu stanice u odnosu na uobičajenu metodu određivanja ukupne koncentracije metala u tkivu to što citosolski metali odražavaju biološki raspoloživu frakciju metala. U skladu s time, podaci o koncentraciji citosolskih metala u jetri potočne pastrve ukazuju da su više koncentracije biološki dostupnih oblika metala prisutne u riba uz područje grada Knina, a time i potencijalna toksičnost u odnosu na izvor rijeke Krke.

Iznimka su značajno više koncentracije Cd u citosolu jetre potočnih pastrva ulovljenih na izvoru rijeke Krke u odnosu na one čije je stanište u dijelu toka uz grad Knin (Slika 14). Povišena koncentracija citosolskog Cd u riba s izvora rijeke Krke se vjerojatno može pripisati prirodnom podrijetlu. Martinez i sur (2002) pretpostavljaju da su povišene koncentracije Cd na izvorima rijeka često povezane s ispiranjem tala obogaćenih organskom tvari i sumporom te poniranjem takve vode u podzemlje. Druga pretpostavka je da su vapnenci i dolomiti, koji dominiraju na prostoru planine Dinare na kojoj se nalazi izvor rijeke Krke (Perica i sur., 2007), obogaćeni spojevima Cd te su uzrok značajno viših koncentracija tog metala u riba ulovljenih kod izvora rijeke Krke (Slika 14). Međutim, kako bi utvrdili izvor izloženosti Cd na izvoru rijeke Krke potrebna su dodatna istraživanja koja bi obuhvaćala i mjerenje koncentracija metala u sedimentu te procjenu izloženosti riba metalima putem hrane (mjerenje koncentracija metala u probavilu) i vode (mjerenje koncentracija metala u škrgama), kako bi se razlučio i procijenio način unosa Cd u organizme na izvoru rijeke Krke.

5.4.2. Biomarkeri

5.4.2.1. Metalotioneini

Upravo zbog pobudne sinteze uzrokovane metalima, MT se koristi kao biomarker izloženosti metalima u riba i drugih organizama (Roesijadi, 1994). Statistički značajno povišene koncentracije MT uočene su u riba s izvora rijeke Krke u odnosu na ribe koje obitavaju u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin (Slika 16). S obzirom da su statistički značajno više vrijednosti zabilježene i za Cd u citosolu jetre pastrva na istoj postaji kao MT (Slika 14), a Cd je jedan od glavnih metala koji dovodi do pobudne sinteze MT, očigledno porast MT prati povišene koncentracije citosolskog Cd.

Već je u nizu istraživanja dokazana pobudna sinteza MT uzrokovana Cd. Dugoročno laboratorijsko izlaganje potočne zlatovčice (*Salvelinus fontinalis*, por. Salmonidae) Cd, rezultiralo je povišenim koncentracijama MT (Hamilton i sur., 1987). De Conto Cinier i sur. (1998) pokazali su da se kod šarana (*Cyprinus carpio*) koncentracija MT značajno linearno povećava s izloženošću Cd u laboratoriju. Krasnići i sur. (2013) su na divljoj populaciji klena (*Squalius cephalus*) dokazali da je među citosolskim proteinima za vezanje Cd odgovoran MT. Također, dokazano je da postoji kompeticija Cd, Cu i Zn za vezna mjesta na MT te u slučaju povišenih koncentracija, Cd može istisnuti Cu i Zn s veznih mjesta na MT (De Conto Cinier i sur., 1998). Povišena koncentracija citosolskog Cd u riba s izvora rijeke Krke u odnosu na dio toka uz grad Knin je vjerojatno prirodnog podrijetla i rezultat je prisustva dolomita i vapnenaca u sastavu sedimenta (Perica i sur., 2007). Zbog toga je prisutna konstantna i očigledno i dominantnu izloženost Cd u odnosu na druge metale na izvoru rijeke Krke, što se odrazilo i na značajno povišene koncentracije MT (Slika 16).

5.4.2.2. Malondialdehid

Lipidnom peroksidacijom dolazi do oštećenja lipida, a kao sekundarni produkti nastaju reaktivni aldehidi poput MDA, koji se koristi kao biomarker oksidativnog stresa. U ovom istraživanju uočene su povećane koncentracije MDA kod jedinki uhvaćenih u području rijeke Krke uz grad Knin tj. u dijelu toka gdje je zabilježen antropogeni utjecaj, ali nisu statistički značajne (Slika 17). Povećane koncentracije MDA mogu se povezati s metalima koji su u

5. RASPRAVA

vodu dospjeli industrijskim ili komunalnim vodama, a s obzirom da oksidativni stres uzrokuju i organske tvari, svakako i one mogu biti uzrok povišenih MDA vrijednosti jer se velikim dijelom unose otpuštanjem otpadnih komunalnih voda grada Knina.

Druga istraživanja su također potvrdila i metale i organska zagađivala kao uzročnike oksidativnog stresa. Doherty i sur. (2010) su u terenskom istraživanju pokazali da je došlo do povećane koncentracije MDA kod riba u Nigeriji izloženih teškim metalima. Lipidnu peroksidaciju uzrokovanu pesticidima istražili su Amin i Hashem (2012), koji su dokazali povećane koncentracije MDA u jetri, bubregu i škragama afričkog soma (*Clarias gariepinus*) nakon izlaganja insekticidu deltametrinu, dok su Klobučar i sur. (1997) dokazali da pentaklorofenol uzrokuje lipidnu peroksidaciju u probavnoj žlijezdi puža *Planorbarius corneus*.

5.4.2.3. Ukupni citosolski proteini

Varijabilnost koncentracije ukupnih citosolskih proteina je indikator općeg stresa organizma (Filipović Marijić i sur., 2010). Razni stresni čimbenici, poput povišene koncentracije metala u vodi i organskih zagađivala, povišene temperature vode, smanjene koncentracije otopljenog kisika, promjena pH mogu dovesti do promjena u koncentraciji citosolskih proteina. Ukupni citosolski proteini su stoga nespecifični biomarkeri staničnog stresa.

U ovom istraživanju ukupni citosolski proteini pokazuju povišene vrijednosti u riba uzorkovanih uz točkaste izvore zagađenja grada Knina, ali bez statističke značajnosti (Slika 18). S obzirom da i ukupni citosolski proteini nisu specifičan biomarker poput MDA, povišene vrijednosti mogu biti povezane s povišenim koncentracijama metala u vodi i citosolu jetre riba, ali i organskim zagađenjem koje je posljedica unosa komunalnih otpadnih voda grada Knina. To potvrđuju i druga istraživanja, odnosno indukciju citosolskih proteina u klena iz rijeke Save u ovisnosti o citosolskim metalima, ali i o fiziološkom stanju riba potvrdili su Filipović Marijić i Raspor (2010), a o različitim organskim zagađivalima Stegeman i sur. (1992).

5. RASPRAVA

Bioški pokazatelji izloženosti zagađivalima u potočne pastrve ne ukazuju na značajne promjene na staničnoj razini u jetri riba ulovljenih u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin. Time je potvrđeno da utjecaj otpadnih tehnoloških i komunalnih voda nije doveo do mjerljivih staničnih promjena u riba, čime bi se potvrdio toksičan utjecaj vanjskih stresora. Svakako, povišene koncentracije ukupnih citosolskih metala u riba ulovljenih uz grad Knin ukazuju na izloženost metalima i njihovu veću bioraspoloživost u riba koje obitavaju u vodotoku rijeke Krke uz grad Knin te u ekotoksikološkim istraživanjima predstavljaju potencijalne biološke pokazatelje izloženosti vodenih organizama metalima.

6. ZAKLJUČCI

Ispitivanje kakvoće rijeke Krke u dijelu toka uz grad Knin ukazuje na očigledan antropogeni utjecaj, koji je posljedica ispuštanja tehnoloških i komunalnih otpadnih voda za koje trenutno ne postoji adekvatan sustav pročišćavanja. S obzirom da je ovo područje smješteno samo 2 km uzvodno od početka Nacionalnog parka Krka, zaključujemo da postoje kontinuirani izvori onečišćenja koji predstavljaju potencijalnu opasnost za očuvanje jako dobrog ekološkog stanja, a time i staništa i bioraznolikosti živog svijeta u Nacionalnom parku Krka.

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

- voda na izvoru rijeke Krke je I. kategorije, odnosno jako dobrog ekološkog stanja;
- fizikalno-kemijski i mikrobiološki čimbenici kakvoće vode ukazuju na pogoršanje ekološkog stanja vode u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin, često i do V. kategorije, odnosno jako lošeg ekološkog stanja;
- usporedba koncentracija ukupno otopljenih metala u vodi ukazuje na unos metala u rijeku Krku u dijelu toka kod tvornice vijaka, kao i uz komunalne otpadne vode, što potvrđuju i koncentracije metala u staničnom citosolu potočnih pastrva, uz izuzetak Cd što se vjerojatno može pripisati prirodnom podrijetlu, ali zahtjeva dodatna istraživanja;
- koncentracije biomarkera izloženosti metalima (metalotioneina) su značajno povišene u riba ulovljenih u rijeci Krki uz grad Knin, i vjerojatno prate razine citosolskog Cd koji je jedan od glavnih metala koji dovodi do pobudne sinteze metalotioneina;
- ostali izmjereni biomarkeri, malondialdehid i ukupni citosolski proteini su povišeni, ali ne značajno u riba koje obitavaju u dijelu toka rijeke Krke uz grad Knin;
- većina čimbenika kakvoće vode ukazuje na poboljšanje ekološkog stanja na postaji nizvodno od grada Knina (prije ušća rijeke Butižnice u Krku), međutim dokazani antropogeni utjecaji potvrđuju da je neophodno provoditi sustavno praćenje kakvoće vode rijeke Krke.

7. ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujemo mentoricama dr. sc. Vlatki Filipović Marijić s Instituta Ruđer Bošković i doc. dr. sc. Jasni Lajtner s Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu na pruženoj prilici za izradu ovog rada, velikoj pomoći prilikom provođenja istraživanja, pisanja rada i interpretacije rezultata.

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

Posebno zahvaljujemo dr. sc. Zrinki Dragun iz Laboratorija za biološke učinke metala i dr. sc. Nevenki Mikac iz Laboratorija za anorgansku geokemiju okoliša Instituta Ruđer Bošković na nesebičnoj pomoći oko mjerenja koncentracija metala za potrebe ovog istraživanja.

Zahvaljujemo se i članovima Laboratorija za biološke učinke metala i Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama Instituta Ruđer Bošković na obavljenim terenskim istraživanjima na rijeci Krki.

Iskreno se zahvaljujemo članovima Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama Instituta Ruđer Bošković, dr. sc. Damiru Kapetanoviću na pomoći oko provođenja mikrobioloških i Zvezdani Šoštar Vulić fizikalno-kemijskih analiza vode.

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

Na kraju, posebno zahvaljujemo Franu Rebrini za poticaj i potporu bez kojih ovaj rad ne bi bio ostvariv.

8. LITERATURA

- Agarwal A., Gupta S., Sharm R. K. (2005): Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3**, str. 28.
- Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P. S. (2006): Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **76**: 160–202.
- Amin K. A., Hashem K. S. (2012): Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Veterinary Research* **8**: 1–8.
- Anke M. K. (2004): Essential and Toxic Effects of Macro, Trace, and Ultra trace Elements in the Nutrition of Animals. U: Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoeppler M. (ur.), *Elements and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. Wiley-VCH, Weinheim, 305–341.
- Ashbolt N. J., Grabow W. O. K., Snozzi M. (2001): Indicators of microbial water quality. U: Fewtrell L., Bartram J. (ur.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. World Health Organization (WHO). Published by IWA Publishing, London, UK, 289–316.
- Bonacci O., Perica S. (1990): Specifičnosti hidrologije sliva Krke, Ekološke monografije knjiga 2, Zbornik radova sa Simpozija: "NP Krka – stanje i problemi zaštite ekosistema, HED, 85–114.
- Botsoglou N. A., Fletouris D. J., Papageorgiou G. E., Vassilopoulos V. N., Mantis A. J., Trakatellis A. G. (1994): Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**: 1931–1937.
- Branica M. (1990): Environmental research in aquatic systems. *Scientific Series of the International Bureau, Forschungszentrum Jülich* **3**: 1–15.
- Branica M. (1999): Tragovi metala u prirodnim vodama. Zbornik radova 2. Hrvatske konferencije o vodama u Dubrovniku, Hrvatske vode, Zagreb, 43–52.
- Catsiki V. A., Stroglyoudi E. (1999): Survey of metal levels in common fish species from Greek waters. *The Science of the Total Environment* **237/238**: 387–400.

8. LITERATURA

- Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): Stanica - molekularni pristup, 3. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
- Cukrov N., Cmuk P., Kwokal Ž., Marguš D., Mlakar M., Omanović D. (2007): Ecotoxic trace metals in waters of "Krka" National Park – Croatia, Proceedings of Second International Conference on Waters in Protected Areas, Nakić Z. (ur.), Zagreb: Croatian Water Pollution Control Society, 226–229.
- Cukrov N. (2008): Tragovi metala u „čistim“ vodama na primjeru rijeke Krke. Voda i mi III. Spevec S. (ur.). Zagreb: Hrvatsko geološko društvo, 17–20.
- Cukrov N., Cmuk P., Mlakar M., Omanović D. (2008): Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of self-purification. *Chemosphere* **72**: 1559–1566.
- De Conto Cinier C., Petit-Ramel M., Faure R., Bortolato M. (1998): Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in *Cyprinus carpio* Tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **61**: 793–799.
- Dix T. A., Aikens J. (1993): Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical Research in Toxicology* **6**: 18–62.
- Doherty V. F., Ogunkuade O. O., Kanife U. C. (2010): Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as indicators of Environmental Pollution in Some Selected Fishes in Lagos, Nigeria. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science* **7**: 359–365.
- Dragun Z. (2006): Određivanje biološki raspoložive koncentracije metala u škrigama klena (*Leuciscus cephalus*) i u vodi. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Dudgeon D., Arthington A. H., Gessner M. O., Kawabata Z. I., Knowler D. J., Lévêque C., Naiman R. J., Prieur-Richard A. H., Soto D., Stiassny M. L. J., Sullivan C. A. (2006): Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* **81**: 163–182.
- Erk M., Ivanković D., Raspor B., Pavičić J. (2002): Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* **57**: 1211–1218.

8. LITERATURA

- Fichet D., Radenac G., Miramand P. (1998): Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Marine Pollution Bulletin*, **36**: 509–518.
- Filipović Marijić V. (2004): Metalotioneini i tragovi metala u nekim ribama jadranskog priobalnog područja Hrvatske. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Filipović Marijić V. (2009): Raspodjela odabranih esencijalnih i toksičnih metala u tkivu, citosolu i crijevnim nametnicima probavila klena (*Squalius cephalus*). Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
- Filipović Marijić V., Raspor B. (2010): The impact of fish spawning on metal and protein levels in gastrointestinal cytosol of indigenous European chub. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **152**: 133–138.
- Filipović Marijić V., Raspor B. (2012): Site-Specific Gastrointestinal Metal Variability in Relation to the Gut Content and Fish Age of Indigenous European Chub from the Sava River. *Water, Air, & Soil Pollution* **223**: 4769–4783.
- Filipović Marijić V., Raspor B. (2014): Relevance of biotic parameters in the assessment of the spatial distribution of gastrointestinal metal and protein levels during spawning period of European chub (*Squalius cephalus*). *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 7596–7606.
- Förstner U., Wittmann G. T. W. (1979): *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag. Berlin
- Gaillardet J., Viers J., Dupré B. (2004): Trace elements in river waters. U: Holland H.D., Turekian K. K. (ur.), *Treatise on geochemistry: Surface and groundwater, weathering, and soils* **3**: 225–272.
- GLOBE program (2003): Priručnik za mjerenja- istraživanje vode. Prevela i prilagodila: Renata Matoničkin Kepčija.
- Goldberg E. D., Bowen V. T., Farrington, J. W., Harvey G., Martin J. H., Parker P. L., Risebrough R. W., Robertson W., Schneider E., Gamble E. (1978): The mussel watch. *Environmental Conservation* **5**: 10–125.

8. LITERATURA

- Halliwell B, Gutteridge J. M. (1984): Oxygentoxicity, oxygenradicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* **219**: 1–14.
- Hamer B., Jakšić Ž., Pavičić-Hamer D., Perić L., Medaković D., Ivanković D., Pavičić J., Zilberberg C., Schroder H. C., Muller W. E. G., Smolaka N., Batel R. (2008): Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquatic Toxicology* **89**: 137–151.
- Hamilton S. J., Mehrle P. M., Jones J. R. (1987): Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society* **116**: 551–560.
- Hamza-Chaffai A., Amiard J. C., Pellerin J., Joux L., Berthet B. (2000): The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **127**: 185–197.
- HRN EN 14011 (2005) Kakvoća vode – Uzorkovanje riba električnom strujom.
- HRN EN ISO 8467:2001 (2001) Kakvoća vode – Određivanje permanganatnog indeksa.
- EN ISO 11905-1:1997 Water quality -- Determination of nitrogen -- Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate.
- EN ISO 6222:1999 Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- Ivanković D., Pavičić J., Erk M., Filipović Marijić V., Raspor B. (2003): Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 1303–1313.
- Izvešće o stanju okoliša Šibensko-kninske županije (2010): Zavod za prostorno uređenje Šibensko-kninske županije.
- Klobučar G. I. V., Lajtner J., Erben R. (1997): Lipid Peroxidation and Histopathological Changes in the Digestive Gland of a Freshwater Snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) Exposed to Chronic and Sub-Chronic Concentrations of PCP. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 128–134.

8. LITERATURA

- Krasnići N., Dragun Z., Erk M., Raspor B. (2013): Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus*). *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 2340–2351.
- Lamková K., Šimková A., Palíková M., Jurajda P., Lojek A. (2007): Seasonal changes of immunocompetence and parasitism in chub (*Leuciscus cephalus*), a freshwater cyprinid fish. *Parasitology Research* **101**: 775–789.
- Lecoecur S., Videmann B., Berny P. H. (2004): Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* **94**: 184–191.
- Livingstone D. R. (1993): Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **53**: 195–211.
- Lositskii N. T., Grigor'ev A. A., Khitrova G. V. (1966): Welding of chemical equipment made from two-layer sheet with titanium protective layer. *Chemical and Petroleum Engineering* **2**: 854–856.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–275.
- Lu Y. Q., Zhang G. D., Jiang M. F., Liu H. X., Li T. (2011): Effects of Li₂CO₃ on Properties of Mould Flux for High Speed Continuous Casting. *Materials Science Forum* **675-677**: 877–880.
- Maitland P. S., Linsell K. (2009): *The Hamlyn Guide to Freshwater Fish of Britain and Europe*. Bounty Books, London, 191–199.
- Marie V., Baudrimont M., Boudou A. (2006): Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two fresh water bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* **65**: 609–617.
- Martinez, C. E., McBride, M. B., Kandianis, M. T.; Duxbury, J. M., Yoon, S., Bleam, W. F. (2002): Zinc sulfur and cadmium-sulfur association in metalliferous peats: evidence from spectroscopy, distribution coefficients, and phytoavailability.

8. LITERATURA

- Environmental Science & Technology **36**: 3683–3689.
- Omanović D., Cukrov N., Kwokal Ž. (2005): Tragovi metala u vodi rijeke Krke. U: Marguš D. (ur.), Knjiga sažetaka. JU "Nacionalni Park Krka", Šibenik, 49.
- Omanović D., Kwokal Ž., Cukrov N., Cmuk P., Mlakar M., Pižeta I., Pavlus N., Špoljarić I., Stojanovska M. (2007): Spatial Distribution of Ecotoxic Trace Metals in Waters of "Plitvička Jezera" National Park - Croatia, Proceedings of Second International Conference on Waters in Protected Areas, Nakić Z. (ur.), Zagreb: Croatian Water Pollution Control Society 217–221.
- Pawar S. B., Shembekar V. S (2012): Studies on the physico-chemical parameters of reservoir at Dhanegoan district Osmanabad (M.S.), India.
- Perica D., Orešić D., Trajbar S. (2007): Geomorfološka obilježja doline i porječja rijeke Krke s osvrtom na dio od Knina do Bilušića buka. Marguš D. (ur.), Zbornik radova sa simpozija Rijeka Krka i Nacionalni park Krka, Šibenik
- Phillips D. J. H., Rainbow P. S. (1993): Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Chapman & Hall, London.
- Pilić Š., Buzov I., Bandalović G. (2012): Ruralni krajolik i očuvanost prirodnog okoliša: Mišljenja i stavovi ispitanika u porječju rijeke Krke. Sociologija **1**: 169–184.
- Piria M., Tomljanović T. (2006): Hidrokemija – skripta za vježbe. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za Ribarstvo, pčelarstvo i specijalnu zoologiju. Zagreb, str. 69.
- Polšak A., Korolija B., Fritz F., Božičević S. (1990): Geološka i hidrogeološka obilježja Nacionalnog parka Krka, Ekološke monografije 2, Hrvatsko ekološko društvo, Zagreb, 15–30.
- Program zaštite okoliša Šibensko-kninske županije (2011): OIKON d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju.
- Raspor B. (2004): Elements and elemental compounds in waters and the aquatic food chain. U: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M (ur.), Elements and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance.

8. LITERATURA

Wiley-VCH, Weinheim, 127–146.

Raspor B., Dragun Z., Erk M. (2005): Examining the suitability of mussel digestive gland to serve as a biomonitoring target organ. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **56**: 139–147.

Riley J. P., Chester R. (1971): *Introduction to Marine Chemistry*, Academic Press, London and NY.

Robbins A. H., Stout C. D. (1992): Crystal structure of metallothionein. U: Stillman M.J., Shaw III, C.F., Suzuki K.T. (ur.), *Metallothioneins: synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes*, VCH Publishers Inc., NY, 31–54.

Roesijadi G. (1994): Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives* **102**: 91–95.

Sadiq M. (1992): *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. Marcel Dekker, Inc., NY.

Scoullou M., Alampei A., Boulouxi A., Malotidi V., Vazeou S. (2005): *Voda u Mediteranu, Obrazovni paket, MIO-ECSDE i GWP-MED*, Mediteranski obrazovni ured za okoliš, kulturu i održivi razvoj, Atena.

Sheehan D., Power, A. (1999): Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **123**: 193–199.

Srebočan E., Strunjak-Perović I., Lasić D., Opačak A., Knežević D. (2014): Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske, Hrvatska agencija za hranu.

Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 22nd edition. (2012): APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation)

Staniskiene B., Matusevicius P., Budreckiene R., Skibniewska K. A. (2006): Distribution of Heavy Metals in Tissues of Freshwater Fish in Lithuania. *Polish Journal of Environmental Studies* **15**: 585–591.

8. LITERATURA

- Stegeman J. J., Brouwer M., Richard T. D. G., Förlin L., Fowler B. A., Sanders B. M., van Veld P. A. (1992): Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett R. J., Kimerly R. A., Mehrle P. M. Jr., Bergman H.L. (ur.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 235–335.
- Šverko V. (1997): *Biologija – Od molekule do organizma*. Profil, Zagreb
- Tallon P., Magajna B., Lofranco C., Leung T. K. (2005): Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. *Water, Air, and Soil Pollution* **166**: 139–166.
- Tesseier A., Turner D. R. (1995): Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems* **3**: 45–103.
- Tušar B. (2004): *Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode*, Croatiaknjiga, Zagreb
- Uredba o klasifikaciji voda (NN 137/2008)
- Ureba o standardu kakvoće voda (NN 89/2010)
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. (2006): Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**: 178–189.
- van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57–149.
- Vašak M., Galdes A., Hill H. A. O., Kägi J. H. R., Bremmer I., Young B. W. (1980): Investigation of the structure of metallothionein by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **19**: 416–425.
- Viarengo A., Nott J. A. (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **104(3)**: 355–372.
- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. (1997): A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to

8. LITERATURA

Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research* **44**: 69–84.

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

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

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

Internetski izvori

URL 1: Nacionalni park „Krka“, (<http://www.np-krka.hr/stranice/nacionalni-park-krka/2.html>, pristupljeno 10.4.2016.)

URL 2: Aqua, (<http://www.aqua.hr/a/tvrdoce-vode>, pristupljeno 12.4.2016.)

URL 3: Dioničko društvo Varkom,
(<http://www.varkom.hr/default.asp?SubItemID=14085&FlashID=14014&ParentID=13713&title=tvrdce>, pristupljeno 21.3.2016.)

Procjena antropogenih utjecaja na rijeku Krku i potencijalne opasnosti za Nacionalni park Krka

Ivana Grgić i Zuzana Redžović

Zahvaljujući sedrenim barijerama te brojnim slapištima i jezerima, rijeka Krka je 1985. godine proglašena nacionalnim parkom. Uz jedinstvene ljepote krajolika, odlikuje se i velikom bioraznolikošću te brojnim endemičnim i ugroženim vrstama. Cilj ovog rada bio je istražiti antropogene utjecaje u području grada Knina (komunalne i tehnološke otpadne vode) koji bi mogli dovesti do pogoršanja kakvoće vode rijeke Krke, a time ugroziti živi svijet i fenomen sedrenih barijera, budući se grad nalazi samo 2 km uzvodno od granice parka. Tvornica vijaka DIV d.o.o. te komunalni ispust grada Knina predstavljaju točkaste izvore zagađenja čiji je utjecaj procijenjen u uzorcima vode te indikatorskom organizmu, potočnoj pastrvi (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758). Uzorkovanje je provedeno u dijelu vodotoka rijeke Krke uz grad Knin, a izvor rijeke Krke je odabran za kontrolnu postaju.

Fizikalno-kemijski i mikrobiološki čimbenici ukazuju na pogoršanje kakvoće vode uz antropogene izvore zagađenja grada Knina, za pojedine čimbenike i do jako loše kakvoće (V. kategorija), dok je na izvoru voda I. kategorije. Koncentracije gotovo svih metala u vodi i staničnom citosolu jetre riba su povišene u dijelu toka uz ispuste otpadnih voda u odnosu na izvor. Uz citosolske metale, određeni su i biomarkeri kao rani biopokazatelji zagađenja (izloženosti metalima- metalotionein (MT), oksidativnom stresu- malondialdehid (MDA), općem stresu- ukupni citosolski proteini). Značajne razlike između postaja su nađene za MT, koji su povišeni u riba s izvora te vjerojatno prate povišene razine citosolskog Cd jer predstavlja glavni metal koji pobuđuje MT sintezu. Povišen Cd u riba s izvora je iznimka među citosolskim metalima i vjerojatno je prirodnog podrijetla. Ostali biomarkeri su povišeni u riba koje obitavaju u dijelu toka uz grad Knin, vjerojatno kao posljedica utjecaja vanjskih stresora na vodene organizme. Prikazani rezultati ukazuju na značajan antropogeni utjecaj na rijeku Krku, koji predstavljaju potencijalnu opasnost za očuvanje kakvoće vode, a time i staništa i bioraznolikosti živog svijeta u Nacionalnom parku Krka te je neophodno provoditi sustavni monitoring i praćenje kakvoće vode rijeke Krke.

Ključne riječi: rijeka Krka, otpadne vode, metali, potočna pastrva, biomarkeri

Evaluation of anthropogenic impact on the Krka River and potential risk to the Krka National Park

Ivana Grgić and Zuzana Redžović

Thanks to the travertine barriers and many cascades and lakes, the Krka River was proclaimed National Park in 1985. This area stands out for unique beauty of landscape as well as for high biodiversity and many endemic and endangered species. The aim of this study was to assess anthropogenic impact which could deteriorate water quality of the Krka River near Town of Knin (municipal and industrial wastewater), which is located only 2 km upstream of the Park borders and consequently, represents threat to the living world and tufa barriers. The influence of the main pollution sources, screw factory named DIV d.o.o. and untreated municipal runoff was estimated in water samples and an indicator organism, brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758). Sampling was performed in the Krka River watercourse near the Town of Knin and in the Krka spring, which is selected as the reference site.

Physico-chemical and microbiological water parameters pointed to deteriorated water quality at location impacted by anthropogenic input from the Town of Knin, for certain parameters even to V class water (very bad quality), in contrast to the Krka spring which is of high ecological status (I class). Levels of the most metals in the water and fish hepatic cytosol are increased in pollution impacted Krka River watercourse compared to the source. In addition to cytosolic metals, biological response was evaluated by using early warning signs of pollution- biomarkers (of metal exposure- metallothionein (MT), of oxidative stress- malondialdehyde (MDA), of general stress- total cytosolic proteins). Significant differences between locations were found only for MT, which was increased in fish from the Krka spring, probably following increase of cytosolic Cd, known as the main MT inducer. Increased Cd in fish from spring is exception among cytosolic metals and probably is of natural origin. Other biomarkers are increased in fish from the watercourse near Knin and probably reflect general pollution impact to aquatic organisms. Presented results indicated significant anthropogenic pressure in the Krka River, which represents potential threat to water quality, and thus the habitat and biodiversity of the living world in the Krka National Park. Therefore, implementation of comprehensive water quality monitoring strategies of the Krka River is required.

Keywords: Krka River, waste waters, metals, brown trout, biomarkers

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Grgić

Rođena sam 15. lipnja 1994. u Bihaću u Bosni i Hercegovini. U OŠ Harmani II krenula sam u rodnom gradu, a nakon 4. razreda sam školovanje nastavila u Zagrebu u OŠ Savski Gaj te sam upisala Klasičnu gimnaziju u Zagrebu. Godine 2013. upisala sam preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno- matematičkog fakulteta i trenutno sam na 3. godini studija. Aktivni sam član Udruge studenata biologije (BIUS) u kojoj sam suvoditeljica Sekcije za vretenca od 2016. godine te sam bila uključena u istraživačko- edukacijski projekt „Papuk 2015“. Također sam sudjelovala na brojnim manifestacijama popularizacije znanosti (Noć biologije, Znanstveni piknik, Znanstveni kvart u okviru programa „Plac znanja“ na Interliberu, Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković „Potraga za jezgrom“), kao i u organizaciji Drugog simpozija studenata bioloških usmjerenja 2016. godine.

11. ŽIVOTOPIS

Zuzana Redžović

Rođena sam 24. rujna 1993. godine u gradu Piešťany u Slovačkoj. Prve dvije godine života provela sam u Slovačkoj, a zatim sam se s roditeljima preselila u Hrvatsku. U Puli sam završila OŠ Monte Zaro te sam upisala Gimnaziju Pula. Daljnje školovanje nastavila sam u Zagrebu, gdje sam 2012. godine upisala preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija upisala sam 2015. godine i trenutno sam prva godina. Sudjelovala sam u znanstveno-popularizacijskim događajima poput Smotre sveučilišta, Znanstvenog piknika, Znanstvenog kvarta u okviru programa „Plac znanja“ na Interliberu, Noći biologije, Otvorenog dana Instituta Ruđer Bošković „Potraga za jezgrom“ i volontirala u Botaničkom vrtu u Zagrebu. Aktivan sam član Sekcije za skakavce i zrikavce i Sekcije za ptice u okviru Udruge studenata biologije (BIUS) te sam bila na istraživačko-edukacijskim projektima na Cresu i Papuku. Ove godine sudjelovala sam i u organizaciji Drugog simpozija studenata bioloških usmjerenja.