

V. Filipović Marijić*, S. Šariri,
T. Mijošek Pavin

Institut Ruđer Bošković,
Bijenička 54, 10000 Zagreb

Integrirana procjena odgovora akvatičkih organizama na izloženost metalima: ekspresija gena, bioraspoloživost, toksičnost i biomarkerski odgovori (BIOTOXMET)

Šifra: IP-2020-02-8502

Prijavitelj: Institut Ruđer Bošković

Voditeljica: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

Partneri:

- Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
- Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“

- Wellfish Diagnostics (Paisley, UK),
- Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety & Innovation (Tulln, Austrija),
- University of Leoben (Leoben, Austrija)

Izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost

1. Uvod

Zahvaljujući brojnim ujezerenjima i slapištima nastalima izdizanjem sedrenih barijera te velikoj raznolikosti staništa i vrsta, krška rijeka Krka predstavlja izrazito vrijedan prirodni fenomen, prepoznat u svjetskim razmjerima. Od 1985. godine većina njezina toka ima status nacionalnog parka (NP) i time posebne mjere zaštite. Međutim, u području gornjeg dijela toka rijeke Krke, koji je uzvodno od granica NP Krka, posebnu prijetnju krškom okolišu predstavljaju komunalne i industrijske otpadne vode koje se ispuštaju u području grada Knina. Vodeni ekosustavi krških područja izrazito su osjetljivi na zagađenje, te je takav kompleksan i dinamičan ekosustav omogućio provođenje projektnih aktivnosti vezanih uz procjenu kakvoće vode, bioloških odgovora na zagađenje, posebno izloženosti metalima te njihove bioraspoloživosti i toksičnosti za organizme, koje se provode 2020. – 2025. u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2020-02-8502 “Integrirana procjena odgovora akvatičkih organizama na izloženost metalima: ekspresija gena, bioraspoloživost, toksičnost i biomarkerski odgovori (BIOTOXMET)”, voditeljice dr. sc. Vlatke Filipović Marijić. Međunarodni istraživački tim (slika 1), koji čine suradnici iz Instituta Ruđer Bošković, Zavoda za istraživanje mora i okoliša (dr. sc. Irena Vardić Smrzlić, dr. sc. Dušica Ivanković, dr. sc. Damir Valić, dr. sc. Zrinka Dragun, dr. sc. Tatjana Mijošek Pavin, dr. sc. Zuzana Redžović, dr. sc. Tomislav Kralj, Ivana Karamatić, doktorandice na projektu Sara Šariri i Marija Kušto te dr.

sc. Željka Fiket, koja je bila odgovorna za pojedine ugovorene usluge), Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (dr. sc. Zorana Kljaković-Gašpić), Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ (dr. sc. Želimira Cvetković), Wellfish Diagnostics iz Paisley, UK (dr. sc. Josip Barišić), Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety & Innovation iz Tullna, Austrija (dr. sc. Andreas Zitek) te University of Leoben iz Leobena, Austrija (dr. sc. Thomas Prohaska, dr. sc. Donata Bandoniene, dr. sc. Johanna Irrgeher), zajednički istražuje antropogene utjecaje na vodu, sediment i organizme rijeke Krke.



Slika 1 – Istraživački tim projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2020-02-8502 BIOTOXMET

2. Ciljevi projekta

- procijeniti sezonske i dugoročne trendove koncentracija metala rijeke Krke i njezinih pritoka u vodi i sedimentu;
- odrediti biološke odgovore organizama na izloženost i/ili učinak metala u različitim okolišnim uvjetima, praćenjem toksičnih učinaka na eksperimentalne organizme (alge i planktonske račiće), biomarkerskih odgovora u riba i nametnika kukaša, histopatoloških promjena probavila riba te koncentracija metala u mekim tkivima (probavilo, mišić) i tvrdim strukturama (ljuske, otoliti) riba;
- procijeniti bioraspoloživost i udio toksične frakcije metala u probavnom tkivu riba;
- odrediti aktivne stanične procese u crijevnih nametnika riba, kukaša, i u probavilu riba u okolišnim uvjetima različite izloženosti metalima.

* Autor za dopisivanje: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić, znanstvena savjetnica, e-pošta: Vlatka.Filipovic@irb.hr



Slika 2 – Prikaz različitih metoda i analitičkih uređaja korištenih tijekom analiza uzoraka u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2020-02-8502 BIOTOXMET

3. Rezultati

U okviru provedenih projektnih aktivnosti potvrđeno je da komunalne i industrijske otpadne vode u području grada Knina narušavaju kakvoću riječne vode i prirodnu dinamiku sezonskih kolebanja vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika. Utvrđene su kao osnovni izvor unosa nutrijenata, organske tvari i metala u rijeku Krku, međutim, unutar granica NP Krka većina vrijednosti ponovno opada na razine tipične za nezagađene krške rijeke.

Praćenje razina i akumulacije metala u organizmima provedeno je u probavilu potočne pastve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758.) i u nametnicima u probavilu riba, kukašima (Acanthocephala). Probavilo je izabrano kao indikatorski organ koji ukazuje na unos zagađivala probavnim putem, koji u slučaju slatkovodnih predatorskih riba može biti važniji od unosa iz vode kroz škrge. Koncentracije metala, biomarkerski odgovori (oksidativni stres, antioksidativni kapacitet, izloženost pojedinim zagađivalima) i testovi toksičnosti također su potvrdili da biološke promjene odražavaju potencijalne toksične učinke otpadnih voda, koje je potrebno dalje pratiti i provoditi sustavni biomonitoring.

Inovativna istraživanja u okviru projekta (slika 2), koja smo proveli prvi put u znanstvenoj zajednici, donijela su prve rezultate u području okolišne parazitologije o biološkim odgovorima crijevnih nametnika kukaša na izloženost metalima te prve podatke o ekspresiji gena i molekularnim mehanizmima odgovornima za iznimno učinkovitu akumulaciju metala u tim crijevnim nametnicima. U području metalomike odredili smo raspodjelu metala i potencijalno vezanje za različite citosolske proteine, kao i proveli po prvi puta diferencijalno centrifugiranje probavila riba da bismo utvrdili unutarstaničnu raspodjelu metala te time njihov

toksični udio. Definirali smo i histopatološke promjene probavila riba koje se mogu primijeniti kao pokazatelji zagađenja. S projektnim suradnicima iz Austrije smo temeljem primjene moderne tehnike spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu s laserskim otparavanjem (LA ICP-MS) odredili i metale u kalcificiranim strukturama riba te definirali njihovu moguću primjenu kao bioindikatora.

Dobiveni podatci se objavljuju u međunarodnim znanstvenim časopisima (Filipović Marijić et al., 2022., Mijošek et al., 2022., Mijošek et al., 2023., Vardić Smrzlić et al., 2023., Šariri et al., 2024., Mijošek et al., 2024.) te prezentiraju na znanstvenim kongresima, a sve projektne aktivnosti se mogu pratiti na mrežnoj stranici <https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-istrazivanje-mora-i-okolisa/Laboratorij-za-bioloske-ucinke-metala/Projekti2/Integrirana-procjena-odgovora-akvatickih-organizama-na-izlozenost-metalima-ekspresija-gena-bioraspodjelu-toksičnosti-i-biomarkerski-odgovori-BIOTOXMET>.

4. Zaključak

Cilj projektnog tima je i dalje provoditi inovativna istraživanja na vodenim organizmima, kao i ekotoksikološke testove na eksperimentalnim organizmima u svrhu određivanja bioloških promjena koje mogu ukazati na utjecaj zagađenja na okoliš. Na temelju provedenih istraživanja, dobivenih rezultata te činjenice da se radi o krškom terenu gdje je olakšano širenje onečišćenja do podzemnih i pitkih voda, važno je ukazati javnosti i lokalnoj zajednici na potrebu provođenja stalnog biomonitoringa, koji će upravo omogućiti donošenje prikladnih mjera i pravodobnu zaštitu rijeke Krke (slika 3).



Slika 3 – Slap Krčić pored izvora rijeke Krke gdje se provodilo uzorkovanje u svrhu procjene kakvoće vode u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2020-02-8502 BIOTOXMET

ZAHVALA

Iskreno zahvaljujemo svim članovima HRZZ projekta IP-2020-02-8502 BIOTOXMET na suradnji i svim provedenim terenskim i

laboratorijskim aktivnostima, diseminaciji rezultata i zajedničkom druženju. Zahvaljujemo Hrvatskoj zakladi za znanost na financijskoj potpori koja je omogućila provođenje ovog istraživanja, nabavu laboratorijske opreme te svih ostalih projektnih aktivnosti.

Literatura

1. V. Filipović Marijić, T. Mijošek, Z. Dragun, A. Retzmann, A. Žitek, T. Prohaska, N. Bačić, Z. Redžović, I. Grgić, N. Krasnići, D. Valić, D. Kapetanović, J. Žunić, D. Ivanković, I. Vardić Smrzlić, M. Erk, Application of Calcified Structures in Fish as Indicators of Metal Exposure in Freshwater Ecosystems, *Environments* **9** (2) (2022) 14, doi: <https://doi.org/10.3390/environments9020014>.
2. T. Mijošek, V. Filipović Marijić, Z. Dragun, D. Ivanković, N. Krasnići, M. Erk, Efficiency of metal bioaccumulation in acanthocephalans, gammarids and fish in relation to metal exposure conditions in a karst freshwater ecosystem, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **73** (2022) 127037, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127037>.
3. T. Mijošek, Z. Kljaković Gašpić, T. Kralj, D. Valić, Z. Redžović, S. Šariri, I. Karamatić, V. Filipović Marijić, Spatial and temporal variability of dissolved metal(loid)s in water of the karst ecosystem: consequences of long-term exposure to wastewaters, *Environ. Technol. Innov.* **32** (2023) 103254, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103254>.
4. Vardić Smrzlić, B. Čolić, D. Kapetanović, S. Šariri, T. Mijošek, V. Filipović Marijić, Phylogeny and genetic variability of Rotifer's closest relatives Acanthocephala: an example from Croatia, *Hydrobiologia* **851** (2023) 2845–2860, doi: <https://doi.org/10.1007/s10750-023-05372-7>.
5. S. Šariri, D. Valić, T. Kralj, Ž. Cvetković, T. Mijošek, Z. Redžović, I. Karamatić, V. Filipović Marijić, Long-term and seasonal trends of water parameters in the karst riverine catchment and general literature overview based on CiteSpace, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **31** (3) (2024) 3887–3901, doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31418-3>.
6. T. Mijošek, S. Šariri, Z. Kljaković-Gašpić, Ž. Fiket, V. Filipović Marijić, Interrelation between environmental conditions, acanthocephalan infection and metal(loid) accumulation in fish intestine: an in-depth study, *Environ. Pollut.* **356** (2024) 124358, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124358>.