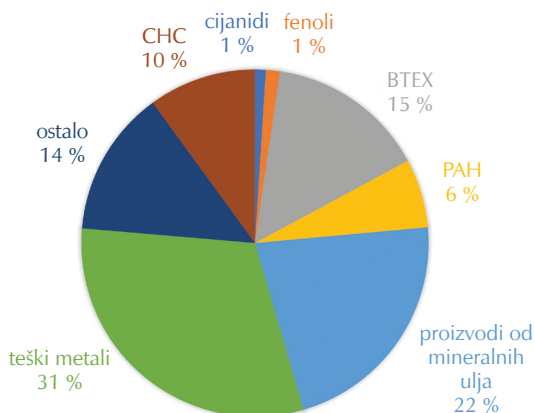


Z. Redžović*

Institut Ruđer Bošković
Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Slatkovodni beskralježnjaci kao bioindikatori izloženosti toksičnim tvarima iz okoliša

Podzemne vode imaju ključnu ulogu u ljudskom životu i razvoju te čine osnovu za život različitih organizama koji obitavaju ispod Zemljine površine. Velik broj kemijskih i bioloških tvari, uglavnom proizvedenih ljudskim aktivnostima, akumulira se u podzemnim vodama, narušavajući netaknutu kvalitetu vode, mijenjajući strukturu i funkciju ekosustava i, posljedično, stvarajući prijetnje svim živim organizmima. Najveća prijetnja kvaliteti podzemnih voda su umjetna gnojiva, pesticidi, proizvodi od mineralnih ulja, klorirana otapala, teški metali i otpadne vode pune hranjivih tvari te patogenih mikroorganizama i virusa (slika 1).¹ Zagađenje podzemnih voda glavni je okolišni pritisak uzrokovan ljudskim aktivnostima, posebice u urbanim područjima Europske unije.² Istraživanja podzemnih voda provode se i u Hrvatskoj, te je tako pokazano da su glavni zagađivači zagrebačkog vodonošnika toksični metali, nitrati, pesticidi i farmaceutici. Prethodna istraživanja rijeke Save pokazala su da je srednji tok rijeke Save pod utjecajem poljoprivrednih aktivnosti i bioloških procesa povezanih s eutrofikacijom, dok je donji tok izložen velikom onečišćenju iz industrijskih postrojenja i komunalnih otpadnih voda.³



Slika 1 – Glavne kategorije onečišćivača koje doprinose onečišćenju podzemnih voda. Kratice: PAH (polciklički aromatski ugljikovodici), CHC (klorirani ugljikovodici), BTEX (benzen, toluen, etilbenzen i ksilen) (prilagođeno prema Panagos i sur.¹)

Zbog sve većeg antropogenog utjecaja na vodene ekosustave, važno je provoditi biomonitoring hiporeičke zone kao osjetljivog ekosustava povezanog s podzemnim vodama. Hiporeička zona prijelazna je zona između površinske i freatičke vode⁴ te spada među najugroženija vodena podzemna staništa. Za praćenje utjecaja onečišćenja u vodenom okolišu rabe se akvatički organizmi koji u sebi akumuliraju zagađivača, a nazivaju se bioindikatorski organizmi. Uz navedeno, ti 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.

Vodeni organizmi osjetljiviji su na izloženost i toksičnost u usporedbi s kopnenim organizmima, uključujući sisavce i u tom pogledu mogu pružiti eksperimentalne podatke za procjenu učinaka oksidativnog stresa, mutagenosti i drugih štetnih učinaka onečišćujućih tvari. Slatkovodni beskralježnjaci koji se najčešće rabe u procjeni izloženosti štetnim tvarima su rakovi, školjkaši, puževi i ličinke vodenih kukaca (tulari, vodencvjetokrišaši, vretenca). Da bi se procijenio utjecaj onečišćujućih tvari na organizme iz rijeke Save, provode se istraživanja na šljunčanim sprudovima (slika 2) u kojima žive stigofilni rakušci vrste *Synurella ambulans* (slika 3), koji su prilagođeni da dio svojeg životnog ciklusa provode u podzemnim, a dio u površinskim vodenim staništima. Osim u hiporeičkoj zoni, ova vrsta može nastanjivati raznolika staništa poput malih vodenih tijela u poplavnim ravnicama, slabo oksigeniranih jezera i močvara, jezera, rijeka, špilja i bunara.



Slika 2 – Uzorkovanje hiporeičke faune na šljunčanom sprudu rijeke Save kod jezera Jarun (foto M. Erk)

Kao što je već spomenuto, metali su jedan od glavnih problema za kvalitetu podzemnih voda. U vodotocima i podzemnoj vodi završava velika količina otpadnih voda iz industrije i poljoprivrede kojima se u okoliš unose metali, što u konačnici ima štetan utjecaj na sve žive organizme.

Metale koji su važna komponenta u metaboličkim procesima živih organizama nazivamo esencijalnim ili biološki nužnim metalima, dok neesencijalni metali već u vrlo niskim koncentracijama mogu dovesti do toksičnih učinaka na organizme. Metali (poput arsena, žive, kadmija, bakra, kroma, olova, željeza, mangana i cinka) akumuliraju se u hranidbenom lancu te su opasni za vodene organizme jer nisu biorazgradivi te jednom uneseni u ekosustav u njemu i ostaju.⁵

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. Bioakumulacija metala u organizmu rezultat je ukupne razlike između unosa metala iz svih izvora i njihova izlučivanja. U svrhu što ranijeg otkrivanja izloženosti štetnim tvarima razvijaju se različiti biomarkeri kao pokazatelji stresa na staničnoj razini organizma. Jedni od najpoznatijih biomarkera izloženosti metalima su proteini metalotioneini čija je uloga održavanje ravnoteže esencijalnih metala te detoksikacija neesencijalnih meta-

* Zuzana Redžović, mag. biol. exp.
e-pošta: zuzana.redzovic@irb.hr



Slika 3 – Slatkovodni beskralježnjak, rakušac vrste *Synurella ambulans* (Amphipoda) koji nastanjuje podzemno stanište rijeke Save (foto S. Gottstein)

la. Tkiva koja su izravno uključena u unos, skladištenje i izlučivanje metala imaju visoku sposobnost sinteze metalotioneina. Kod vodenih organizama ona obuhvaćaju probavnu žlijezdu te škrge kod mekušaca i rakova. Do indukcije sinteze metalotioneina kod beskralježnjaka (npr. mekušaca, rakova, riba) dolazi prilikom izloženosti metalima poput srebra, kadmija, bakra i žive. Primjerice, pokazano je da se koncentracije metalotioneina u slatkovodnom školjkašu *Anodonta grandis* povećavaju s povećanjem gradijenta kontaminacije kadmijem u okolišu.⁶ Također, povećane koncentracije metalotioneina zabilježene su u rakušcima vrste *Gammarus balcanicus* uzorkovanim na postaji u blizini ispusta komunalnih i industrijskih voda grada Knina u odnosu na nezagađeni izvor rijeke Krke, što se može povezati s povišenim koncentracijama bakra i cinka na zagađenoj lokaciji.⁷

Energija nesumnjivo ima središnju ulogu u funkcioniranju organizama te sve stanice zahtijevaju veliku količinu energije da bi održale složenu strukturu biomolekula. Svi organizmi, od najjednostavnijih bakterija do ljudskih stanica, upotrebljavaju ATP (adenozin-trifosfat) kao glavni izvor energije za metaboličke reakcije. Brojni fiziološki pokazatelji omogućuju nam razumijevanje načina na koji se organizmi nose s promjenama u okolišu, a jedan od njih je raspodjela i pohrana energetske zaliha. Pod utjecajem okolišnog stresa vodeni organizmi povećavaju svoje energetske potrebe da bi aktivirali fiziološke mehanizme kompenzacije (homeostazu). Adeninski nukleotidi (adenozin-monofosfat – AMP, adenozin-difosfat – ADP i adenozin-trifosfat – ATP) od iznimne su važnosti u metabolizmu stanice te sudjeluju kao kofaktori u brojnim enzimatskim reakcijama. Energijski naboj adenilata (engl. *adenylate energy charge*, AEC) pokazatelj je energijskog statusa metabolizma stanice i odražava mjeru raspoložive energije iz rezervoara adenilata. Određivanje i kvantifikacija adeninskih nukleotida u biološkim uzorcima provodi se tehnikama tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s reverznom fazom (RP-HPLC), koje su korisne za izolaciju i kvantifikaciju nukleotida u ekstraktima bioloških tkiva. Vrijednost AEC-a može biti u rasponu od 0 do 1, pri čemu su vrijednosti 0,8 do 0,9 uobičajene za organizme koji žive u nezagađenim okolišima, dok su niže vrijednosti u rasponu između 0,7 i 0,5 karakteristične za organizme izložene metalima ili drugim zagađivačima iz okoliša. Promjene u ekološkim ili fiziološkim parametrima, poput onečišćenja, toplinskog i osmotskog stresa, anoksičnih uvjeta, gladovanja ili reproduktivnog statusa, dovode do smanjenja AEC-a.⁸ Stoga se AEC primjenjuje kao indikator odgovora akvatičkih organizama na okolišni stres.⁹ Istraživanje AEC indeksa u rakušcu *Gammarus fossarum* koji živi u potocima u jugozapadnoj Njemačkoj pokazalo je trend smanjenja vrijednosti AEC-a s povećanjem onečišćenja metalima i pesticidima.¹⁰

Uvjeti u hiporeičkoj zoni mogu biti relativno teški za život, s niskim koncentracijama hranjivih tvari i ugljika, ograničenim otopljenim kisikom, odsutnošću svjetlosti i ograničenjem slobodnog prostora. Zbog nedostatka kisika podzemni organizmi razvili su različite strategije, kao što su smanjena stopa metabolizma, velike količine glikogena i uporaba anaerobnih putova. Da bi se procijenio anaerobni potencijal vodenih beskralježnjaka, provode se mjerenja aktivnosti triju enzima: piruvat kinaze (PK), fosfoenolpiruvat karboksikinaze (PEPCK) i laktat dehidrogenaze (LDH). Enzim PK je marker za aerobni metabolizam, dok su PEPCK i LDH markeri anaerobnog metabolizma. Omjer enzima PK/PEPCK je indeks relativnog aerobnog kapaciteta a smanjenje tog omjera ukazuje na smanjenje aerobnog kapaciteta organizma.

Fokusiranjem samo na tradicionalne ekološke metode, koje se temelje na praćenju brojnosti organizama tijekom duljeg razdoblja (nekoliko godina), teško je uočiti sporu i kontinuiranu degradaciju uvjeta u okolišu. Stoga je potrebno primjenjivati fiziološke pokazatelje stanja organizma da bi se pravodobno mogli procijeniti ekološki problemi. Multiomarkerski pristup, koji obuhvaća mjerenje većeg broja biomarkera izloženosti zagađivačima na jednom organizmu, nužan je u okolišima koji su izloženi različitim skupinama zagađivača za procjenu bioloških odgovora organizama. Zaključno, upotreba slatkovodnih beskralježnjaka u biomonitoringu i procjena ekološkog statusa voda od iznimne su važnosti da bi se slatkovodni ekosustavi adekvatno zaštitili i očuvali.

Literatura

1. P. Panagos, M. Van Liedekerke, Y. Yigini, L. Montanarella, Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network, J. Environ. Public Health **2013** (2013) 158764, doi: <https://doi.org/10.1155/2013/158764>.
2. European Environment Agency, Environment in the European Union at the Turn of the Century. Environment Assessment Report No. 2. Copenhagen, Denmark: European Environment Agency, 1999.
3. R. Markovics, T. Kanduč, K. Szramek, D. Golobočanin, R. Milačić, N. Ogrinc, Chemical dynamics of the Sava riverine system, J. Environ. Monit. **12** (2010) 2165–2176, doi: <https://doi.org/10.1039/COEM00121J>.
4. S. Gottstein, Priručnik za određivanje podzemnih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, Hrvatska, 2010., str. 87–93.
5. P. G. C. Campbell, P. M. Chapman, B. A. Hale, Risk assessment of metals in the environment. U: R. E. Hester, R. M. Harrison (ur) Chemicals in the Environment: Assessing and managing risk, The Royal Society of Chemistry, London, UK, 2006., str. 102–131.
6. Y. Couillard, P. G. C. Campbell, A. Tessier, Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve *Anodonta grandis* along an environmental cadmium gradient, Limnol. Oceanogr. **38** (1993) 299–313, doi: <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.2.0299>.
7. T. Mijošek, V. Filipović Marijić, Z. Dragun, D. Ivanković, N. Krašnići, M. Erk, S. Gottstein, J. Lajtner, M. Sertić Perić, R. Matonićkin Kepčija, Comparison of electrochemically determined metallothionein concentrations in wild freshwater salmon fish and gammarids and their relation to total and cytosolic metal levels, Ecol. Indic. **105** (2019) 188–198, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.05.069>.
8. S. L. Shofier, R. S. Tjeerdema, Effects of hypoxia and toxicant exposure on adenylate energy charge and cytosolic ADP concentrations in abalone, Comp. Biochem. Physiol. **119** (1998) 51–57, doi: [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(97\)00181-3](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(97)00181-3).
9. A. M. Ivanovici, Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms, Helgol. Mar. Res. **33** (1980) 556–565, doi: <https://doi.org/10.1007/BF02414779>.
10. R. O. Schill, H. R. Köhler, Does the environment or the source of the population define stress status and energy supply in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum*? Ecotoxicology **13** (2004) 683–695, doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-002-4428-2>.