

Biološka raspoloživost različitih oblika metala u morskom ekosustavu i biomarkeri njihovoj izloženosti*

KUI 8/2005.
Prispjelo 2. veljače 2004.
Prihvaćeno 29. ožujka 2004.

V. Filipović Marijić i B. Raspor

Laboratorij za biološke učinke metala
Zavod za istraživanje mora i okoliša
Institut Ruđer Bošković; p. p. 180; 10002 Zagreb

Unesena količina metala u priobalnom području morskog ekosustava raspodjeljuje se između vode, sedimenata ili organizama. Određivanje količine metala u svakom od tih odjeljaka ima određene nedostatke. Osim ukupne koncentracije metala treba poznavati kemijske oblike metala i njihov utjecaj na organizme, te složene procese raspodjele i detoksifikacije metala u stanici. S biološkog stajališta razlikujemo esencijalne (biološki nužne, poput natrija (Na), kalija (K), magnezija (Mg), kalcija (Ca), željeza (Fe)) i toksične metale (štetno djeluju na organizme, poput žive (Hg), kadmija (Cd), olova (Pb), srebra (Ag)). Posljedice njihovog djelovanja na organizam ovise o putevima unosa metala, njegovom obliku i bioraspoloživosti, te vrsti organizma i njegovom položaju u hranidbenom lancu. Kako su prirodne masene koncentracije prijelaznih metala u vodama niske ($< 1 \text{ mg l}^{-1}$), što odražava i naziv "metali u tragovima", unos manjih količina metala u vodni ekosustav može imati vidljive posljedice. Zbog toga je važno pratiti promjene staničnih struktura ili funkcija koje su posljedica izloženosti toksičnim tvarima putem biomarkera. Biomarkeri izloženosti metalima su metalotioneini, niskomolekularni proteini odgovorni za homeostazu esencijalnih i detoksifikaciju toksičnih metala. Sustavno praćenje (biomonitoring) metalotioneina temelji se na njihovoj indukciji u prisustvu metala cinka (Zn), kadmija (Cd), bakra (Cu), te razlikujemo bazalnu i pobudnu razinu metalotioneina. Praćenje razina metalotioneina u školjkaša i riba priobalnog područja Jadranskog mora, kao ranog pokazatelja promjena izazvanih metalima, provodi interdisciplinarna skupina istraživača u Laboratoriju za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković.

Ključne riječi: *Metali, kemijski oblici metala, specijacija, metalotioneini, biomarkeri*

Uvod

Zagađenje morskog ekosustava

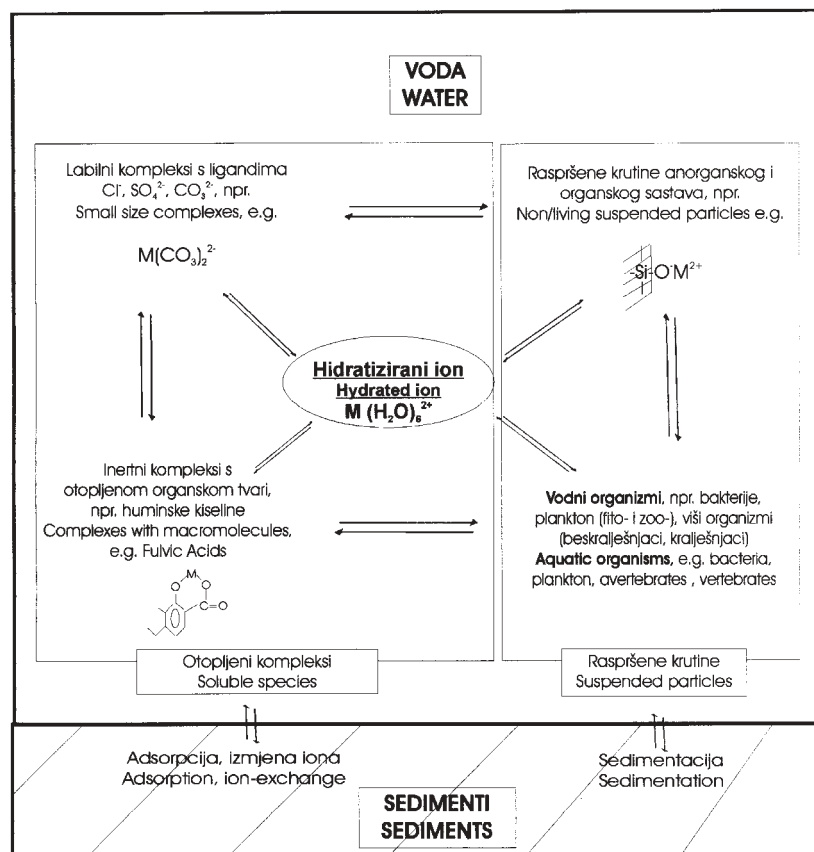
Zbog tehnološkog napretka čovječanstva u okoliš se unose različita zagađivala koja često premašuju njegov prihvatni kapacitet, što dovodi do zagađenja. Zagađenje se definira kao izravni ili neizravni unos tvari, vibracija, topline ili buke u zrak, vodu ili tlo, kao posljedica ljudske aktivnosti, koji može štetno utjecati na zdravlje ljudi i kvalitetu okoliša, izazvati oštećenja materijalnih dobara ili umanjiti vrijednosti prirodnog okoliša.¹ U morskom je ekosustavu zagađenjem najviše zahvaćen obalni pojas, a izvori zagađenja obalnog mora nalaze se pretežito na kopnu, tj. zagađivala se unose neobrađenim otpadnim vodama domaćinstava i/ili industrije, ispiranjem tla (pogotovo poljoprivrednog), oborinskim ispiranjem iz atmosfere itd. Radi izbjegavanja štetnih posljedica onečišćenja mora potrebno je nadzirati količinu zagađivala koja s kopna dospijevaju u more. Republika Hrvatska je potpisnica *Konvencije o zaštiti Sredozemnog mora od onečišćenja*² i pripadajućih protokola. Temeljem *Protokola o zaštiti Sredozemnog mora od onečišćenja s kopna*² i *Mediterranskog akcijskog plana (MAP)*³ obvezna je pratiti količine zagađivala koje se iz izvora na kopnu upuštaju u more.

Raspon zagađivala je velik, od metala do raznovrsnih organskih spojeva koji čine stresore za biosferu. Postoje temeljni razlozi za primjenu odgovarajućih mjera zaštite voda od zagađenja metalima. U prvom redu metali se ne mogu niti kemijski niti biološki razgraditi. Metali uneseni otpadnim vodama i/ili padalinama u vodotoke i obalno more mogu promijeniti kemijski oblik te postati manje toksični, međutim, iz biogeokemijskog kruženja se ne mogu ukloniti. Npr. reakcijama taloženja ili kompleksiranja toksičnost ionskog oblika metala se smanjuje, međutim promjenom fizikalno-kemijskih uvjeta metal može ponovno prijeći u toksični oblik. Kemijska sličnost toksičnih metala s biološki nužnim metalima uzrokuje toksične učinke koji ovise o koncentraciji specifičnih kemijskih oblika koji su biološki dostupni organizmu, a ne o ukupnoj koncentraciji metala. U idealnom slučaju, za procjenu toksičnog djelovanja metala na vodne organizme trebalo bi raspolagati pouzdanim podacima o ukupnoj koncentraciji, biološki raspoloživoj koncentraciji metala te o toksičnosti pojedinih kemijskih oblika metala.

* Rad posvećen prof. dr. sc. Marku Branici, koji je potaknuo njegovo pisanje

Esencijalni i toksični metali

Budući da su prirodne koncentracije prijelaznih metala u vodama niske ($<1 \text{ mg l}^{-1}$), što odražava i naziv "metali u tragovima", svaki dodatni unos utječe na njihovu koncentraciju i remeti ravnotežnu raspodjelu u vodnom ekosustavu. Iz vode se metali koncentriraju u sedimente i biotu, gdje se raspodjeljuju u abiotske i biotske odjeljke. Relativna količina metala u tragovima u svakom odjeljku ovisi o njihovoj fizičko-kemijskoj reaktivnosti i stupnju postignutih vremenski uvjetovanih reakcija. Na slici 1 shematski su prikazani odjeljci vodnog sustava i općenito naznačene kemijske reakcije metalnih iona.



Slika 1 – Shematski prikaz mogućih reakcija hidratiziranog metalnog iona s komponentama vodnog ekosustava (prema Buffle⁴)

Fig. 1 – Schematic overview of possible reactions of hydrated metal ion with the components of aquatic ecosystem (according to Buffle⁴)

S obzirom na metaboličke procese u organizmu razlikujemo dvije skupine metala, biološki nužne i toksične metale. Biološki nužni metali važni su za normalno odvijanje metaboličkih procesa u organizmima. U tu skupinu ubrajamo npr. makroelemente Na, K, Mg i Ca, te mikroelemente Mn, Fe, Co, Cu, Zn. Navedeni mikroelementi su, uz Mo, dio enzimskog sustava i nužni su za rast i razvoj organizama. Međutim, biološki nužni metali imaju blagotvorno djelovanje samo u optimalnom koncentracijskom području. Povećanjem koncentracije iznad optimalne, biološki nužni metali postaju štetni.

Metali za koje do sada nije ustanovljeno da imaju ikakav utjecaj u metaboličkim procesima nazivamo toksičnima. U skupinu toksičnih metala ubrajamo Cd, Hg, Pb, Ag. Kationi

prijelaznih metala stvaraju kovalentne veze s elektron-dorskim skupinama sumpora, npr. tiolnim –SH, disulfidnim –S–S–, tioeterskim –SR, odnosno dušika, npr. amino skupinama –NH₂ i heterocikličkim dušikovim spojevima.⁵ Zbog kemijske sličnosti, na staničnoj razini, toksični metali mogu zamijeniti nužne metale u molekuli koja ima određeno biološko djelovanje i time izazvati metabolički poremećaj, te ovisno o njihovoj količini i smrtnost. *Ochiai*⁶ je objasnio da nespecifično vezanje metala uzrokuje toksičnost na staničnoj razini:

- vezanjem na nužne funkcionalne skupine biološki važnih molekula;
- ionskom zamjenom nužnih metalnih iona na biološki važnim molekulama;
- promjenom aktivne konformacije biološki važnih molekula.

Bioakumulacija metala

Zagađenost priobalnog morskog područja ocjenjuje se iz rezultata određivanja metala u uzorcima vode, odnosno u sedimentima i organizmima koji se nalaze na različitim stupnjevima hranidbenog lanca. Unos metala u organizam iz okolišne vode može se odvijati putem cijele vanjske površine organizma, putem određenih respiratornih organa (škrge, pluća), putem probavnog epitela iz vode i hrane ili kombinacijom tih putova.⁷ Ako se unos metala pretežito odvija putem vode, govorimo o biokoncentraciji metala; ako se nakupljanje metala u organizmu odvija putem vode i hrane, govorimo o bioakumulaciji, pri čemu akumulirana količina metala odražava razliku brzina unosa i izlučivanja metala. Biomagnifikacija je posebna vrsta bioakumulacije u kojoj količina metala u organizmu premašuje količinu tog istog metala u hrani, a povećava se slijedom hranidbenog lanca. U ekotoksikološkoj se literaturi bioakumulacija, biokoncentracija i biomagnifikacija izražavaju faktorima.⁸ U realnim uvjetima teško je razlučiti udjel nakupljenog metala koji odgovara unosu iz vode od onog iz hrane, pa se uglavnom razmatra bioakumulacija metala i bioakumulacijski faktor (BAF): $BAF = C_B/C_V$, te biomagnifikacijski faktor (BMF): $BMF = C_B/C_H$, u kojima je C_B količina metala u bioti, C_V u vodi i C_H u hrani.

Za toksične je metale važno ustanoviti postoji li bioakumulacija ili čak biomagnifikacija, te je radi toga uobičajen pristup određivanje raspodjele metala između vode i organizama u blizini izvora zagađenja i na nekoj udaljenosti od tog izvora i izražavanje bioakumulacijskih faktora.

Za razliku od ostalih metala u skupini prijelaznih metala Hg čini izuzetak jer je za nju bitna biomagnifikacija. Ustanovljena je povećana količina Hg u ribama u usporedbi s fitoplanktonom, što znači da se količina Hg povećava slijedom hranidbenog lanca. U velikim ribama je količina Hg povećana zbog preklapanja učinaka trofičke razine i starosti.

Biomagnifikacija Hg vezana je uz selektivno zadržavanje metil-žive na svakom od trofičkih stupnjeva. Tome su razlog neobično velika sposobnost zadržavanja metil-žive i dugačko biološko vrijeme zadržavanja vezano uz dugovječnost organizama na vrhu hranidbenog lanca (npr. tune). Udjel Hg u organizmima povećava se uglavnom kao lipofilna metil-živa (10 % u fitoplanktonu, 20 % u beskralježnjacima, te 90 % u ribama).⁹ Biomagnifikacija metil-žive tumači se činjenicom da za taj kemijski oblik na staničnoj razini ne postoje procesi kojima bi se smanjila njezina trofička raspoloživost. Za razliku od Hg, suvišak i toksičnost drugih prijelaznih metala smanjuje se njihovim pohranjivanjem u odjeljke unutar tkiva, kao što su vakuole, granule, teško topljivi ili inertni kompleksi, koji se obično ne prenose slijedom hranidbenog lanca.¹⁰

Rezultati određivanja koncentracije metala u vodi i jestivim organizmima uspoređuju se s "maksimalno dopuštenim koncentracijama", koje su navedene u Narodnim novinama br. 46¹¹ i 78.¹² Pri tome se zanemaruje činjenica da voda čini dinamički medij, pa koncentracije metala odražavaju stanje samo u trenutku uzorkovanja. Nasuprot tome, biota odražava vremenski ovisnu i akumuliranu količinu zagađivala. Osim ovih osnovnih razlika, postoje još neki nedostaci u pristupu prosudbe stupnja zagađenosti morskog ekosustava određivanjem koncentracije toksičnih metala u morskoj vodi, a to su:

- ukupna koncentracija određenog metala u vodi ne odražava biološki raspoloživu koncentraciju metala;
- dio laboratorija koji određuju koncentracije metala u vodi nemaju za to prikladnu opremu i nisu metodološki osposobljeni za rad.

Drugačiji pristup, u kojem ukupna količina metala u tkivu organizma služi za prosudbu stupnja zagađenosti morskog okoliša, ima nedostatak što ta količina ne odražava metabolički i trofički raspoloživu količinu metala jer sadrži i trofički "imobilizirani" dio, nataložen u vakuolama/granulama ili slabo topljivim kompleksima, koji će organizam izlučiti, pa se neće povećati unutarstanično raspoloživa koncentracija metala. Iz dosadašnjeg obrazloženja zaključujemo da u ocjeni stupnja zagađenja morskog ekosustava treba primijeniti takav pristup koji će pružiti informaciju o biološki raspoloživoj koncentraciji metala i njegovom utjecaju na staničnoj razini, kombinirajući biokemijske, biološke i kemijske pokazatelje. Takvim pristupom, koji ćemo obrazložiti u nastavku, dobivamo podatke o metabolički dostupnoj koncentraciji metala i mogućim ranim oštećenjima koja uzrokuju te koncentracije.^{13,14} Takav pristup omogućuje pravodobnu ocjenu potrebe uvođenja zaštitnih mjera prije nego nastupe promjene na razini populacije.

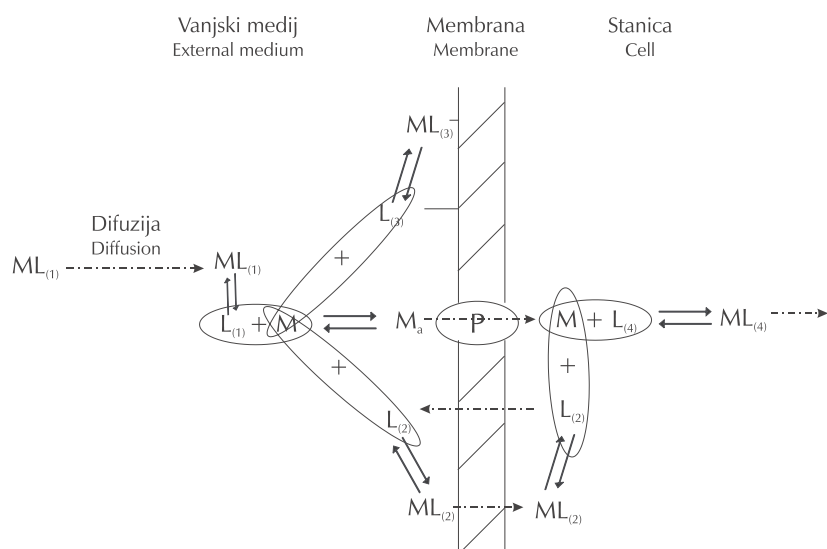
Unos metala u organizme

Za unos metala u vodne organizme najvažniji su voda i hrana, pri čemu metal mora biti u biološki raspoloživom obliku, a to je hidratizirani oblik¹⁵ koji je za katione

prijelaznih metala koordiniran sa šest molekula vode (središnji dio slike 1). Slijed fizikalno-kemijskih reakcija prilikom unosa metala u organizam potvrđuje važnost poznavanja postojećih kemijskih oblika metala, što je povezano s njihovom kemijskom reaktivnosti, a time i toksičnosti. Metali ulaze u stanicu prolazom kroz ionske kanale u fosfolipidnom dvosloju (membrani).¹⁶ U tkivu se pohranjuju u vakuolama/granulama ili vežu na ligande, čime se smanjuje toksičnost ionskih oblika metala.¹⁷ Najveću opasnost za vodne organizme predstavljaju metali koji imaju raznovrsnu uporabu, a čije su soli dobro topljive u vodi. Štetni utjecaj nastupa ako se s esencijalnim metalima, kao nužnim mikronutrijentima, u organizam unose i toksični metali (Hg, Pb, Cd, Ag), koji mogu narušiti homeostazu organizma i time štetno djelovati na različitim organizacijskim razinama, od stanice do populacije. Važno je još jedanput naglasiti da toksično djelovanje metala ovisi o biološki dostupnoj koncentraciji, a ne o ukupnoj koncentraciji metala.

Molarni udjel (%) hidratiziranih, biološki raspoloživih oblika nužnih i toksičnih metala različit je, što ćemo objasniti na nekoliko primjera. U uvjetima morske vode citotoksični oblici $[Cd^{2+}]_{aq}$ i $[Pb^{2+}]_{aq}$ iznose samo 3 %¹⁸, a $[Cu^{2+}]_{aq}$ 5 %.¹⁹ Preostali ionski oblici raspodijeljeni su u različite (labilne) komplekse s anorganskim ligandima Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- . Nasuprot tome, udjeli hidratiziranih oblika metala koji su nužni u enzimatskim sustavima (Zn^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+}) iznose 42 %, dok je ostatak ionskih oblika također raspodijeljen na komplekse s različitim anorganskim anionima. Za Hg kao toksični prijelazni metal, raspodjela ionskih kemijskih oblika je potpuno drugačija; pretežito je zastupljen oblik $HgCH_3Cl$ (60 %) i $HgCl_4^{2-}$ (26 %), dok je udjel hidratiziranog oblika zanemariv.¹⁹

Očita je razlika u biološki raspoloživom udjelu mikrokationa prijelaznih metala za esencijalne (oko 40 % za Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}), od citotoksičnih metala (oko 3 % za Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}), dok udjel hidratiziranih oblika biološki nužnih makrokationa iznosi za Na^+ 83 %, K^+ 78 %, a za Ca^{2+} i



Slika 2 – Shematski prikaz različitih putova unosa metala kroz staničnu membranu organizma (prema Buffle⁴)

Fig. 2 – Schematic overview of different routes of metal uptake through the cell membrane of the organism (according to Buffle⁴)

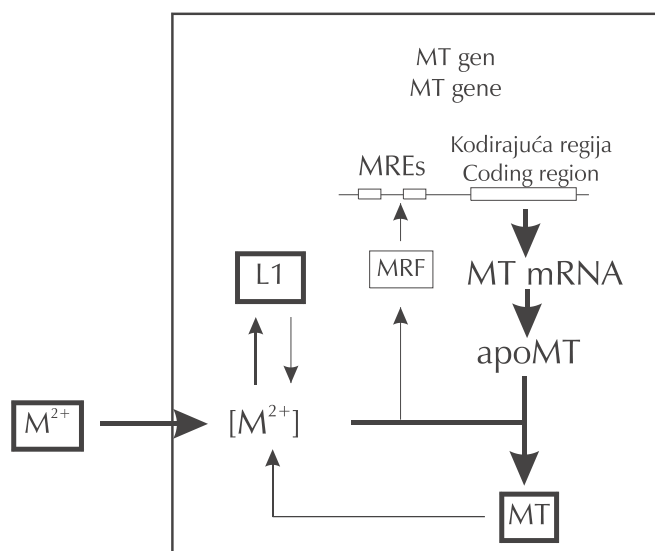
Mg²⁺ oko 45 %.¹⁶ Ovim primjerom se potvrđuje važnost poznavanja raspodjele kemijskih oblika metala u prirodnim morskim uvjetima radi prosudbe toksičnosti i biološke akumulacije metala, jer različiti oblici metala na različite načine prolaze kroz membranu.

Prvi kontakt koji organizmi ostvaruju s vanjskim okolišem odvija se preko opne/kože, škruga i probavila, a unos metala odvija se preko stanične membrane. Ioni prijelaznih metala ulaze u stanicu kroz hidrofilne pore u hidrofobnoj staničnoj membrani. Nenabijeni metalni kompleksi, npr. HgCH₃Cl i Hg(CH₃)₂ su lipofilni, pa slobodno difundiraju kroz hidrofobnu staničnu membranu.^{20,21} Unos metala kroz staničnu membranu čini kompleksni niz reakcija, shematski prikazanih na slici 2, gdje M označava metal, a L₁₋₄ različite vrste liganada.

Prijenos iona kroz membranu omogućuju uobičajeni prijenosnici, prijenosni proteini, ionski kanali i ionske pumpe. Prolazom kroz membranu metali ulaze u stanični citozol, gdje se vežu na unutarstanične ligande.

Stanični biomarkeri

Na slici 3 shematski su prikazane interakcije u staničnom citozolu.



Slika 3 – Transkripcija metalotioneinskog gena i ekspresija apo-proteina pobuđena povećanom koncentracijom metala u staničnom citozolu (prema Roesijadi¹⁷)

Fig. 3 – Metallothionein gene transcription and apoprotein expression induced by higher metal concentration in the cell cytosol (according to Roesijadi¹⁷)

U početnoj fazi akutne izloženosti metalima u detoksifikaciji sudjeluje glutation (= L1), koji djeluje i kao antioksidans. Glutation također može vezati metale (Cu, Cd, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn) i sudjelovati u ranoj detoksifikaciji, npr. kompleksiranjem ili redukcijom citotoksičnog oblika Cu²⁺ u Cu⁺, budući da je pokretanje dodatnih detoksifikacija mehanizama vremenski uvjetovano pobudnom sintezom specifičnog proteina, apotioneina (apoMT).²² Ako bi koncentracija unesenog metala bila veća od kapaciteta vezanja

unutarstaničnih liganada nastupilo bi toksično djelovanje u skladu s objašnjenjem Ochiaia.⁶ Međutim, zaštitno djelovanje metalotioneina (MT) sastoji se u *de novo* sintezi apoproteina koja nastupa vezanjem unesenih metala na “transacting factor” (MRF), koji time mijenja konformaciju i veže se na “metal regulatory elements” (MREs) metalotioneinskog gena (MT gen). Time se potiče povećan intenzitet transkripcije MT gena, što uzrokuje povećanje koncentracije metalotioneina. S pomoću mRNA, koja nosi kod za dodatnu sintezu metalotioneina, potiče se ekspresija apotioneina, koji zatim veže metalne ione koji su pobudili indukciju. Upravo zbog inducibilnosti, metalotioneini se rabe kao indikatori (biomarkeri) izloženosti organizama nekim prijelaznim metalima. Zbog tog svojstva razlikujemo bazalnu, primarno prisutnu koncentraciju uključenu u homeostazu esencijalnih metala (Zn, Cu), te inducibilnu koncentraciju MT, uključenu u detoksifikaciju toksičnih metala (Hg, Ag, Cd). Metalotioneine nalazimo u citozolu stanice, a ponekad i u jezgri i lizosomima.²³ Od prve izolacije tog proteina iz kore konjskog bubrega koju su 1957. godine objavili Margoshes i Vallee, do danas metalotioneini su izolirani iz raznih skupina organizama i raznih tkiva, s time da imaju sličnu konzervativnu strukturu, što ukazuje na biološku važnost proteina.^{24,25} Nju karakterizira čak 30 % cisteinskih skupina odgovornih za vezanje metala, niska molekulska masa oko 6 do 7 kDa, nedostatak aromatskih kiselina, te toplinska stabilnost.²⁶

Određivanje metalotioneina kao staničnih biomarkera izloženosti morskih organizama metalima ima prednost jer pruža informaciju o metabolički, a time i trofički dostupnoj koncentraciji metala, dok količina metalotioneina služi za ocjenu može li metabolički raspoloživa koncentracija metala izazvati stanično oštećenje. Takva istraživanja usmjerena su na rano otkrivanje subletalnih promjena na staničnoj razini organizma putem biomarkera.²⁷ Huggett i sur.²⁷ definiraju biomarkere kao promjene staničnih struktura ili funkcija koje su posljedica izloženosti toksičnim tvarima, a njihov razvoj i primjena su posljedica potrebe za što ranijim određivanjem i prosudbom učinka malenih količina zagađivala. Razvoj započinje 1979. kada je Bayne karakterizirao biološke parametre specifične za “sindrome stresa” inducirane u dagnji akumulacijom zagađivala. I u drugih morskih organizama su uočene različite fiziološke promjene na staničnoj razini, a zbog sposobnosti apsorpiranja i koncentriranja zagađivala iz vode organizmi su se počeli upotrebljavati kao biološki pokazatelji onečišćenja (bioindikatori, najčešće mekušci, raci i ribe).²⁸ Biomarkeri daju informaciju o biokemijskom odgovoru organizma na tvari, koje doprijevši do mjesta toksičnog djelovanja izazivaju mjerljivi i specifični učinak njihovom pobudnom sintezom. Prednosti istraživanja učinka metala na morske organizme putem biomarkera su sljedeće:

- vremenski integrirani odgovor organizma na biološki raspoloživu koncentraciju metala;
- povezivanje početnog i konačnog učinka izlaganja morskih organizama metalima, što čini osnovicu za prosudbu rizika izloženosti.

Osim na staničnoj razini, promjene u organizmu mogu se pratiti i na razini tkiva i organa, te preko organizma do viših organizacijskih razina sve do ekosustava. Važnost je praćenja promjena upravo na staničnoj razini, tj. putem biomarkera u njihovom specifičnom i ranom odgovoru na promje-

ne ravnotežnog stanja u organizmu, koje mogu neizravno ukazivati i na promjene u okolišu, ovisno o tome što ih je izazvalo. Za razliku od ranih signala poremećaji na razini populacije manje su specifični i daju odgovor tek nakon dugotrajne izloženosti, a time je toksičnim učinkom već zahvaćena cijela populacija.

Važno je naglasiti da na koncentraciju metalotioneina osim metala utječu i drugi abiotički (temperatura, salinitet, pH) i biotički čimbenici (reproduktivni ciklus, hormoni). Zato je nužno za svaku vrstu organizma pa čak i različite organe iste vrste organizma odrediti bazalnu količinu metalotioneina kako bi se ispravno interpretirali rezultati. Tek nakon tako definiranih početnih uvjeta sustavnim praćenjem može se ustanoviti izloženost metalima, uzimajući u obzir i abiotičke i biotičke pokazatelje.

Prema programu MED POL, u monitoring-studijama najčešći su indikatorski organizmi školjkaši (*Mytilus galloprovincialis*, *M. edulis*, *Perna perna*), te pridnene ribe (*Mullus barbatus*, *M. surmuletus*, *Upeneus mollucensis*). Odabir organizama temelji se na činjenici da sesilni organizmi (dagnje) ili manje migratorni organizmi (neke bentičke ribe) najbolje odražavaju promjene u lokalnom okolišu u kome žive.

Biomonitoring-studije u RH

Interdisciplinarni pristup praćenja učinka izlaganja vodnih organizama metalima putem biomarkera predmet je temeljnih i primijenjenih izučavanja Laboratorija za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković, koja se uz potporu MZOŠ-a provode od 1996. godine.²⁹ Također se uvodi integrirano praćenje obalnog područja Jadranskog mora kroz hrvatski nacionalni projekt "Jadran" te međunarodni projekt u suradnji s Norwegian Institute for Water Research (NIVA) iz Osla. Cilj programa sustavnog praćenja zagađenja putem biomarkera je da se ustanovi subtoksično djelovanje čimbenika stresa na organizme u određenom priobalnom području Jadrana. Kao indikatorski organizmi odabrani su dagnja *Mytilus galloprovincialis* te ribe *Mullus barbatus*, *M. surmuletus* i *Liza aurata*. Važno je provoditi sustavno praćenje kako bi se ustanovile sezonske promjene u tkivu bioloških vrsta uzrokovane hormonskim promjenama, mrijestom, temperaturom, salinitetom i razlučile od promjena uzrokovanih unosom metala iz raspršenih izvora. Na temelju razlika u bazalnoj i induciranoj koncentraciji metalotioneina može se zaključivati da li postoji subtoksični utjecaj metala na organizme. Uspješan rad na tim projektima omogućava suradnja znanstvenika i istraživača iz raznih prirodoslovnih područja (biologa, kemičara, veterinar), a sustavno praćenje biomarkera, uz kemijske i fizikalne pokazatelje daje uvid u rane promjene stanja biote i okoliša, a time i uvođenje pravovaljanih mjera zaštite.

Literatura

References

- 2(2) Direktiva o cjelovitoj prevenciji i kontroli onečišćenja br. 96/61/EC, Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja: Strategija gospodarenja otpadom RH (2003) 35.
- Odluka o objavljivanju mnogostranih međunarodnih ugovora kojih je Republika Hrvatska stranka na temelju notifikacija o sukcesiji, Narodne novine **12** (1993).

- Med pol phase III, Programme for the Assessment and Control of Pollution in the Mediterranean Region, MAP Technical Reports Series 120, UNEP, Athens, 1999.
- J. Buffle, Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988.
- A. Z. Mason, K. D. Jenkins, Metal Detoxification in Aquatic Organisms, u A. Tessier, D. R. Turner (urednik), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, Vol. 3, John Wiley and Sons, 1995, str. 479–608.
- E. I. Ochiai, *Bioinorganic Chemistry: An Introduction*, Allyn and Bacon, Boston, 1977.
- M. T. Brown, M. H. Depledge, Determinants of trace metal concentrations in marine organism, u W. J. Langston, M. J. Bebbiano (uredn.), Metal Metabolism in Aquatic Environments, Chapman and Hall, London, 1998, str. 185–217.
- F. A. P. C. Gobas, H. A. Morrison, Bioconcentration and Biomagnification in the Aquatic Environment, u R. S. Boethling, D. Mackay (uredn.), Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 2000, str. 189–231.
- M. R. Preston, Marine Pollution, u J. P. Riley (uredn.), Chemical Oceanography, Vol. 9, Academic Press, London, 1988, str. 54–196.
- J. A. Nott, Metals and Marine Food Chains, u W. J. Langston, M. J. Bebbiano (uredn.), Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chapman and Hall., London, 1998, str. 387–414.
- Pravilnik o količinama pesticida, toksina, mikotoksina, metala i histamina i sličnih tvari koje se mogu nalaziti u namirnicama, te o drugim uvjetima u pogledu zdravstvene ispravnosti namirnica i predmeta opće uporabe, Narodne novine **46** (1994).
- Uredba o opasnim tvarima u vodama, Narodne novine **78** (1998).
- P. S. Rainbow, J. Mar. Biol. Ass. U. K. **77** (1997) 195.
- W. G. Wallace, S. N. Luoma, Mar. Ecol. Prog. Ser. **257** (2003) 125.
- K. D. Jenkins, B. M. Sanders, Environ. Health Perspect. **65** (1986) 205.
- K. Simkiss, M. G. Taylor, Transport of Metals Across Membranes, u A. Tessier, D. R. Turner (uredn.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, Vol. 3, John Wiley and Sons, 1995, str. 1–44.
- G. Roesijedi, Aquat. Toxicol. **22** (1992) 81.
- L. Sipos, B. Raspor, H. W. Nürnberg, R. M. Pytkowicz, Interaction of Metal Complexes With Coulombic Ion-Pairs in Aqueous Media of High Salinity, Marine Chemistry **9** (1980) 37.
- S. Ahrlund, Trace Metal Complexation by Inorganic Ligands in Sea Water, u T. S. West, H. W. Nürnberg (uredn.), The Determination of Trace Metals in Natural Waters, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, str. 223–252.
- K. Simkiss, Mar. Biol. Ass. **63** (1983) 1.
- J. G. Sanders, G. F. Riedel, Metal Accumulation and Impacts in Phytoplankton, u W. J. Langston, M. J. Bebbiano (uredn.), Metal Metabolism in Aquatic Environments, Chapman and Hall, London, 1998, str. 59–76.
- V. Filipović, B. Raspor, Zbornik radova 3. Hrvatske konferencije o vodama u Osijeku, Hrvatske vode, Zagreb, 2003, str. 241–246.
- W. J. Langston, M. J. Bebbiano (uredn.), Metal Metabolism in Aquatic Environments, Chapman and Hall, London, 1998.
- R. D. Palmiter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) 8428.
- E. H. Fischer, E. W. Davie, Proc. Natl. Acad. Sci. **95** (1998) 3333.

26. J. H. R. Kägi, Evolution, Structure and Chemical Activity of Class I Metallothioneins: An Overview, u K. T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura (uredn.), *Metallothionein III, Biological Roles and Medical Implications*, Birkhäuser, Basel, 1993, str. 29–55.
27. R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle, H. L. Jr., Bergman, Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, *Proceedings of the Eighth Pellston Workshop Keystone, Colorado*, Lewis Publishers, 1989.
28. Y. Kojima, *Methods in Enzymology* **205B** (1991) 8.
29. <http://bib.irb.hr/>

SUMMARY

Bioavailability of Different Metal Species in Marine Ecosystem and Biomarkers of their Exposure

V. Filipović Marijić and B. Raspor

Metals, which are introduced to the coastal areas of the aquatic ecosystem, are distributed between water, sediments and organisms. Determination of metals in every of these aquatic compartments has certain disadvantages. It is important to know, besides total metal concentration, chemical forms of metals and their impact on the organisms, and also complex processes of metal distribution and detoxification within the cells. From the biological point of view there is a difference between essential (necessary for the organisms, like sodium (Na), potassium (K), magnesium (Mg), calcium (Ca), iron (Fe)) and toxic metals (without any biological role and potentially harmful to the organisms, like mercury (Hg), cadmium (Cd), lead (Pb), silver (Ag)). The consequences of metal exposure for organisms depend on the routes of metal uptake, their chemical forms and bioavailability, species biology and their position in the food chain. Concentrations of toxic metals in the water column are very low ($<1\text{ mg l}^{-1}$), what describes the name "trace metals". Therefore, input of even small amounts of metals in the aquatic ecosystem can be harmful. Because of that fact it is very important to define changes in the cell structure and functions by means of biomarkers, as a consequence of exposure to toxic metals. Biomarkers of metal exposure are metallothioneins, low molecular mass proteins responsible for homeostasis of essential and detoxification of toxic metals. Continuous field survey (biomonitoring) of metallothioneins is based on their induction in the presence of metals (Zn, Cd, Cu), assuming the differences between basic and induced metallothionein level are evident. Biomonitoring of metallothionein levels in bivalves and fish of near-shore area of the Adriatic Sea, as an early warning signal of metal exposure, is conducted by the multidisciplinary group of scientists in the Laboratory for Biological Effects of Metals at the Ruđer Bošković Institute.

*Laboratory for Biological Effects of Metals
Center za Marine and Environmental Research
Ruđer Bošković Institute; P. O. Box 180; 10002 Zagreb, Croatia*

*Received February 2, 2004
Accepted March 29, 2004*