



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Grgić

**UTJECAJ VIŠESTRUKIH STRESORA NA
BIOLOŠKE KOMPONENTE
SLATKOVODNIH EKOSUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Grgić

**IMPACT OF MULTIPLE STRESSORS ON
THE BIOLOGICAL COMPONENTS OF
FRESHWATER ECOSYSTEMS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023

Ovaj je doktorski rad izrađen na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Marka Rožmana i izv. prof. dr. sc. Ane Previšić u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je financirano u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Višestruki stresori u vodenom okolišu – razumijevanje svojstava stresora i receptora“ (IP-2018-01-2298). Sredstva za zapošljavanje doktoranda osigurana su iz projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“.

INFORMACIJE O MENTORIMA

dr. sc. Marko Rožman

Marko Rožman rođen je 1975., godine u Zagrebu gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirao je 2000. godine na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon stečene diplome zapošljava se na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za fizičku kemiju, gdje je danas na poziciji višeg znanstvenog suradnika. Sudjeluje u međunarodnim i domaćim projektima iz područja analitičke kemije, medicine i slatkovodne ekotoksikologije te sudjeluje u vođenju diplomskih i doktorskih radova. Područje njegovog znanstvenog rada i interesa je vezano uz primjenu spektrometrije masa u istraživanjima metaboloma, proteoma, glikolipidoma te obrade podataka dobivenih spektrometrijom masa. Koautor je na 45 znanstvenih radova i 48 sažetaka s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Znanstveno se usavršavao u Sloveniji na Institutu Jožef Stefan, u Velikoj Britaniji na Sveučilištu u Manchesteru, te u Španjolskoj na Katalonskom institutu za istraživanje voda. Osvojio je stipendije: CMEPIUS i Marie Curie za provođenje istraživanja u Sloveniji i Španjolskoj te je dobitnik nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu.

izv. prof. dr. sc. Ana Previšić

Ana Previšić rođena je 1978. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 2002. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,, a 2009. godine doktorirala na istoj instituciji. Zaposlena je na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu od 2004. godine, prvo kao stručna suradnica na projektu te je danas u zvanju izvanrednog profesora. Na Biološkom odjeku sudjeluje u nastavi kolegija: Zoogeografija, Biogeografija, Ekologija kukaca, Osnove molekularne ekologije, Opća ekologija, Ekologija životinja, Ekologija kopnenih voda, Ekologija onečišćenih voda te u terenskoj nastavi za studente. Također, mentorica je završnih, diplomskih i doktorskih radova te jednog rada nagrađenog Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u istraživanjima koja se provode u sklopu domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih projekata iz područja ekologije slatkovodnih ekosustava. Područje njezinog znanstvenog rada i interesa je raznolikost, taksonomija, filogenija, filogeografija i ekologija vodenih kukaca, makrozoobentos tekućica i stajaćica, te odgovori slatkovodnih zajednica na višestruke stresore. Koautorica je 65 znanstvenih radova, 3 stručna rada, 1 sveučilišnog udžbenika, 1 poglavlja u knjizi i 67 sažetaka s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Znanstveno se usavršavala u Velikoj Britaniji na Sveučilištu u Manchesteru, u Njemačkoj na institutu Biodiversity i Climate Research Centre te u Španjolskoj na Katalonskom institutu za istraživanje voda. Dobitnica je Godišnje nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu za znanstveni doprinos iz područja biologije.

ZAHVALE

Veliko hvala mentorima dr. sc. Marku Rožmanu i izv. prof. dr. sc. Ani Previšić što su mi svojim znanjem i savjetima pomogli da lakše savladam problematiku ekotoksikologije i analitičke kemije te uspješno provedem ovo istraživanje.

Osobito hvala dr. sc. Zrinki Karačić na velikom trudu i pomoći prilikom određivanja koncentracije proteina te na širenju zarazne pozitivne energije i optimizma. Također, veliko hvala dr. sc. Ines Sviličić Petrić, Heleni Senko i Ani Ramljak na savjetima i pomoći u provođenju mikrobioloških metoda, dr. sc. Lari Mikac i dr. sc. Katarini Cetinić na pomoći prilikom obrade uzoraka mikroplastike te Mateju Kernu na pomoći prilikom identifikacije metabolita.

Hvala kolegama s Katalonskog instituta za istraživanje voda – ICRA na provedbi pokusa u sustavu umjetnih tekućica.

Puno hvala svim kolegama s Instituta Ruđer Bošković, prijateljima i obitelji na potpori u svim lijepim i teškim trenucima. Najveće hvala Franu koji je uz sve svoje obaveze uvijek pronašao vremena da mi pruži svoju pomoć ili samo prijeko potrebne riječi ohrabrenja.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Utjecaj višestrukih stresora na biološke komponente slatkovodnih ekosustava

Ivana Grgić

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Vodeni ekosustavi izloženi su brojnim prirodnim i antropogenim pritiscima. Glavni cilj ovog istraživanja je praćenje procesa i molekularnih odgovora ključnih sastavnica slatkovodnih ekosustava prilikom izlaganja višestrukome stresu. U tu svrhu postavljeni su laboratorijski pokusi na i) tularima i makrofitima izloženima mikroplastici, farmaceuticima i endokrinim modulatorima te ii) obraštaju izloženom suši i kemijskom onečišćenju. Za istovremenu karakterizaciju stresora i praćenje molekularnih odgovora organizama razvijena je sveobuhvatna metoda koja omogućuje detekciju onečišćivala (farmaceutika, endokrinih modulatora i mikroplastike), metabolita i proteina iz jednog uzorka tkiva. Analizirajući promjene u regulaciji metabolita i ukupnoj količini proteina, istraživanje na tularima i makrofitima pruža uvid u štetne učinke mikroplastike na vodene organizme te uspoređuje utjecaj mikroplastike s utjecajima farmaceutika i endokrinih modulatora. Eksperiment na obraštaju ukazuje na dinamično međudjelovanje mikrobne zajednice i okoliša prilikom izlaganja stresu uzrokovanom presušivanjem i farmaceuticima. Stres uzrokovan presušivanjem oblikuje mikrobnu zajednicu, koja pak pod utjecajem onečišćivala mijenja kemijski sastav okoliša.

(119 stranica, 28 slika, 6 tablica, 238 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: tulari, mahovina, obraštaj, nova onečišćivala, proteini, metaboliti, antibiotska rezistencija

Mentori: Dr. sc. Marko Rožman

Izv. prof. dr. sc. Ana Previšić

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

Dr. sc. Ivana Babić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Impact of multiple stressors on the biological components of freshwater ecosystems

Ivana Grgić

Ruder Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Freshwater ecosystems are subject to numerous natural and anthropogenic pressures. The main objective of this research was to investigate the processes and molecular responses of several key components of freshwater ecosystems while exposed to multiple stressors. To this end, laboratory experiments were conducted with i) caddisflies and macrophytes exposed to microplastics, pharmaceuticals and endocrine disruptors, and ii) biofilms exposed to drought and a mixture of emerging contaminants. A robust method was developed for simultaneous characterisation of stressors and monitoring the corresponding molecular responses of organisms, allowing the detection of emerging contaminants (pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and microplastics), metabolites and proteins from a single tissue sample. By analyzing metabolic and total protein variations, the experiment on caddisflies and macrophytes provides valuable insights into adverse effects of microplastics on aquatic organisms and compares the effects of microplastics with those of pharmaceuticals and endocrine disruptors. The biofilm experiment shows a dynamic interaction between the microbial community and its environment during exposure to desiccation and emerging contaminants. Desiccation stress shapes the microbial community, which in turn, under the influence of emerging contaminants, modulates chemical composition of the environment.

(119 pages, 28 figures, 6 tables, 238 references, original in Croatian)

Keywords: caddisflies, moss, biofilm, emerging contaminants, proteins, metabolites,
antibiotic resistance

Supervisors: Marko Rožman, PhD
Assoc. Prof. Ana Previšić, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Mirela Sertić Perić, PhD
Vlatka Filipović Marijić, PhD
Ivana Babić, PhD

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi i hipoteze	3
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Važnost razvoja metode za istovremeno praćenje molekularnih odgovora na stres	5
2.2. Farmaceutici i endokrini modulatori u slatkovodnim ekosustavima	6
2.3. Mikroplastika u slatkovodnim ekosustavima	8
2.4. Utjecaji višestrukih stresora na slatkovodne organizme	10
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Razvoj metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka	13
3.1.1. Kemikalije i reagensi	13
3.1.2. Prikupljanje uzoraka	15
3.1.3. Priprema i obrada uzoraka	16
3.1.4. Pročišćavanje uzoraka	17
3.1.5. Analiza spojeva spektrometrom masa	17
3.1.6. Utjecaj matrice i iskoristivost metode	18
3.1.7. Učinkovitost izolacije mikroplastike u različitim okolišnim uzorcima	19
3.1.8. Učinkovitost izolacije proteina korištenjem različitih surfaktanata	20
3.1.9. Statistička obrada podataka	21
3.2. Istraživanje utjecaja mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora na strukturu metaboloma i proteoma mahovine i tulara	21
3.2.1. Kemikalije i reagensi	21
3.2.2. Prikupljanje uzoraka i provođenje pokusa	22
3.2.3. Priprema i obrada uzoraka	24
3.2.4. Analiza metabolita	25
3.2.5. Statistička obrada podataka	26
3.3. Istraživanje utjecaja onečišćenja i suše na raznolikost mikrobne zajednice i strukturu metaboloma u obraštaju	27
3.3.1. Prikupljanje uzoraka i provođenje pokusa	27

3.3.2.	Analiza metabolita i otopljene organske tvari	29
3.3.2.1.	Kemikalije i reagensi	29
3.3.2.2.	Priprema uzoraka za analizu metabolita i otopljene organske tvari	30
3.3.2.3.	Obrada podataka	30
3.3.3.	Analiza mikrobne zajednice obraštaja	31
3.3.3.1.	Kemikalije i reagensi	31
3.3.3.2.	Izolacija nukleinskih kiselina	32
3.3.3.3.	Sekvenciranje 16S rRNA hipervarijabilne regije	33
3.3.3.4.	Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu	34
3.3.3.5.	Analiza podataka i statistički postupci	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1.	Razvoj metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka	36
4.1.1.	Utjecaj SPE kolona na učinkovitost izolacije	36
4.1.2.	Utjecaj matrice	36
4.1.3.	Iskoristivost metode	39
4.1.4.	Izolacija mikroplastike iz okolišnih uzoraka	39
4.1.5.	Učinkovitost izolacije proteina upotrebom različitih surfaktanata	40
4.1.6.	Kratki opis razvijene metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka	41
4.2.	Istraživanje utjecaja mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora na strukturu metaboloma i proteoma mahovine i tulara	43
4.2.1.	Zastupljenost čestica mikroplastike u mahovini i sedimentu	43
4.2.2.	Zastupljenost čestica mikroplastike u različitim razvojnim stadijima tulara	44
4.2.3.	Mikroplastika u kućicama tulara	45
4.2.4.	Unos čestica mikroplastike u tularu konzumiranjem mahovine	46
4.2.5.	Utjecaj mikroplastike, smjese farmaceutika i endokrinih modulatora na tularu	47
4.2.6.	Razlike u mehanizmima obrane od stresa između mužjaka i ženki tulara	49
4.2.7.	Promjena u metaboličkim putevima tulara izloženih stresu	50
4.2.8.	Ukupna koncentracija proteina u tularima izloženim stresu	53

4.2.9.	Promjena metaboličkog profila u mahovinama izloženim stresu	55
4.2.10.	Promjena metaboličkog odgovora mahovine izložene stresu	56
4.2.11.	Promjena ukupne koncentracije proteina u mahovini izloženoj stresu	58
4.3.	Istraživanje utjecaja onečišćenja i suše na raznolikost mikrobne zajednice obraštaja i strukturu metaboloma	60
4.3.1.	Utjecaj vremena kolonizacije i tretmana na sastav obraštaja	60
4.3.2.	Utjecaj onečišćenja na ekspresiju gena za bakterijsku rezistenciju na antibiotike u obraštaju	64
4.3.3.	Utjecaj vremena kolonizacije i presušivanja na metabolom mikrobne zajednice u obraštaju	66
4.3.4.	Utjecaj vremena kolonizacije i onečišćivala na promjene u sastavu otopljene organske tvari u obraštaju	67
4.3.5.	Unutarstanični odgovor obraštaja na presušivanje i onečišćenje	69
5.	ZAKLJUČCI	70
6.	POPIS LITERATURE	71
7.	PRILOZI	101
8.	ŽIVOTOPIS	119

Popis kratica

SPE – kolona za ekstrakciju u čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*)

UPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

FT-IR – infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

cDNA – komplementarna DNA

qPCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time* ili *quantitative PCR*)

ASV – amplikonske sekvence (eng. *amplicon sequence variant*)

SDS – natrijev dodecil-sulfat

DTT – ditiotritol

TAE – puferska otopina koja sadrži mješavinu Tris baze (tris(hidroksimetil)aminometan),
octene kiseline i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)

BSA – goveđi serum albumin (eng. *bovine serum albumin*)

ANOVA – analiza varijance (eng. *analysis of variance*)

rANOVA – analiza varijance ponovljenih mjerenja (eng. *repeated measures ANOVA*)

PRC – analiza krivulja glavnih odgovora (eng. *principal response curves*)

PCoA – analiza glavnih koordinata (eng. *principale coordinate analysis*)

PCA – analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*)

SMA – jednostavni pomični prosjek (eng. *simple moving average*)

Početak-S – presušivanje na početku pokusa

Početak-T – stalan tok na početku pokusa

Kraj-T – stalan tok bez onečišćenja na kraju pokusa

Kraj-TO – stalan tok s onečišćenjem na kraju pokusa

Kraj-S – presušivanje bez onečišćenja na kraju pokusa

Kraj-SO – presušivanje s onečišćenjem na kraju pokusa

1.UVOD

U današnje vrijeme, uslijed globalnih klimatskih promjena, povećane industrijalizacije te povećanog iskorištavanja vodnih resursa, većina slatkovodnih ekosustava je pod utjecajem različitih stresora. Pod pojmom „stresor“ podrazumijeva se bilo koji biotički ili abiotički pritisak koji sustav izbacuje iz stanja ravnoteže, pri čemu dolazi do promjena u procesima koji se odvijaju unutar sustava (Schulte, 2014). Međunarodnim konvencijama i regulativama nastoji se ograničiti utjecaj stresora na vodna tijela te time smanjiti njihovu degradaciju. U Europskoj uniji status vodnih tijela reguliran je Okvirnom direktivom o vodama, s ciljem postizanja njihovog dobrog ekološkog i kemijskog stanja (EU 2015/495). Dosadašnji protokoli za praćenje stanja slatkovodnih ekosustava usmjereni su na „tradicionalne stresore“ kao što su organsko i anorgansko onečišćenje, eutrofikacija, hidromorfološke promjene te promjene u zemljišnom pokrovu (EU 2015/495). Međutim, u posljednje vrijeme sve se više uviđa negativni utjecaj klimatskih promjena i brojnih onečišćujućih tvari na vodene organizme i ekosustave. U tzv. „nova onečišćivala“ (eng. *emerging contaminants*) svrstavaju se tvari koje nisu uključene u sustav monitoringa, ali dopijevaju u okoliš i mogu negativno utjecati na organizme i ekosustave (Petrović i sur., 2003; Tewari i Paroha, 2021). Među nova onečišćivala svrstavaju se: farmaceutici, proizvodi za osobnu higijenu, endokrini modulatori, mikroplastika te brojni industrijski dodaci (Sauvé i Desrosiers, 2014). U prirodne vodotoke nova onečišćivala najčešće se unose ispuštanjem komunalnih, industrijskih i poljoprivrednih otpadnih voda (Gogoi i sur., 2018). Uslijed svakodnevne upotrebe (često i nekontrolirane) te činjenice da prolaze kroz postrojenja za obradu otpadnih voda, „pritisak“ novih onečišćivala na okoliš je konstantan. Sukladno tome, njihova prisutnost utvrđena je u vodi za piće, površinskoj vodi, sedimentu i mulju (Fekadu i sur., 2019; Li i sur., 2018; Previšić i sur., 2021a). Nadalje, potvrđena je prisutnost onečišćivala u vodenim biljkama i životinjama svih veličinskih kategorija te njihov utjecaj na fiziološko stanje organizama (Birklett, 2003; Heye i sur., 2019b; Kratina i sur., 2019; Rahman i sur., 2009; Rozman i sur., 2022; Shaliutina-Kolešová i sur., 2020). Istraživanja usmjerena na praćenje dinamike i toksičnog učinka novih onečišćivala na organizme nadograđuju još uvijek nedostatna znanja koja su nužna za definiranje prioriteta u praćenju stanja i zaštiti slatkovodnih ekosustava (Sauvé i Desrosiers, 2014).

Međutim, osim kemijskog onečišćenja (zagađenja), danas se suočavamo sa sve izraženijim utjecajima klimatskih promjena. Brojna novija istraživanja su usmjerena u praćenje posljedica klimatskih promjena te predlaganje mjera za njihovo ublažavanje zbog mnogostrukog utjecaja na svim razinama ekološke organizacije, od organizma do ekosustava (Pecl i sur., 2017). Ubrzana promjena klime na globalnoj razini, popraćena sve učestalijim ekstremnim pojavama kao što su suše i poplave, uzrokuje promjene u kruženju ugljika i organske tvari, strukturi hranidbenih mreža te bioraznolikosti slatkovodnih ekosustava (Wrona i sur., 2006).

Osim što klimatske promjene imaju negativan utjecaj na slatkovodne zajednice, njihova kombinacija s drugim stresorima može uzrokovati dodatni stres slatkovodnim organizmima utječući pritom na njihovu prehranu, reprodukciju, emergenciju i mortalitet. To dovodi do činjenice da stresori u prirodnim ekosustavima gotovo nikad ne djeluju na organizme pojedinačno, nego su prisutna brojna međudjelovanja biotičkih i abiotičkih stresora, prirodnog kao i antropogenog podrijetla (Serra i sur., 2020). Učinci kombinacije stresora (višestruki stresori) u vodenom okolišu najčešće nisu jednaki zbroju učinaka pojedinih stresora (aditivni učinak), nego njihova interakcija dovodi do pozitivnog (sinergizam) ili negativnog (antagonizam) djelovanja jednog stresora na drugi (Romero i sur., 2018). Međutim, većina dosadašnjih spoznaja o djelovanju stresora u okolišu utemeljena je na rezultatima istraživanja utjecaja pojedinačnih stresora na određeni organizam, zajednicu ili ekosustav, što najčešće ne odražava situaciju u prirodi. Stoga, istraživanja utjecaja višestrukih stresora na različite komponente prirodnih ekosustava stvaraju preduvjet za bolje razumijevanje interakcija i procesa koji se odvijaju pod utjecajem stresora te time omogućuju realniju procjenu njihovog utjecaja na ekosustav u cjelini.

Za dobivanje cjelokupne slike o utjecaju (višestrukih) stresora na organizme, potrebno je pratiti promjene na različitim razinama, od ekosustava pa sve do molekularnih promjena u pojedinom organizmu. Promjene na molekularnoj razini omogućuju detektiranje vrlo ranih utjecaja stresa te praćenje bioloških odgovora na stres (Pinu i sur., 2019; Segner i sur., 2014; Subirats i sur., 2018). Razvojem novih tehnologija omogućeno je paralelno praćenje utjecaja stresa na nekoliko molekularnih razina, čime se produbljuje znanje o složenim odgovorima organizama na (višestruki) stres (Altshuler i sur., 2011). Dosadašnja istraživanja pokazuju da kombinacija više molekularnih analiza daje potpunija i informativnija saznanja o biološkim procesima (Nakayasu i

sur., 2016), ali u slučaju organizama manje veličine tijela (npr. kukci) može biti izazovna zbog ograničene količine tkiva.

1.1. Ciljevi i hipoteze

Osnovni cilj ovog rada je pružiti multidisciplinarni pogled na molekularne odgovore glavnih komponenti slatkovodnog ekosustava (vodenih beskralježnjaka, makrofita i obraštaja) u okolišu obilježenom antropogenim stresorima (farmaceutski aktivnim spojevima, endokrinim modulatorima i mikroplastikom) te klimatskim promjenama (presušivanjem), kao i na procese koji su posljedica djelovanja (višestrukog) stresa.

Prema tome postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

- i) razviti metodu za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala (farmaceutski aktivnih spojeva, endokrinih modulatora i mikroplastike) te metabolita i proteina iz jednog uzorka tkiva;
- ii) procijeniti molekularne odgovore vodenih beskralježnjaka (kukaca iz reda tulara; Insecta: Trichoptera) te vodenih makrofita iz skupine mahovina (Bryophyta) na izloženost farmaceuticima, endokrinim modulatorima i mikroplastici u pojednostavljenom modelu slatkovodnog ekosustava;
- iii) sagledati molekularne odgovore obraštaja na izloženost višestrukom stresu (farmaceuticima i presušivanju).

S obzirom na navedene ciljeve postavili smo sljedeće hipoteze:

- i) učinkovitost razvijenog protokola za simultanu izolaciju onečišćivala, metabolita i proteina bit će u skladu s učinkovitošću dosadašnjih protokola za pojedinačnu obradu uzoraka, dok će utrošak vremena i potrebnog tkiva biti manji;
- ii) sastavnice pojednostavljenog modela slatkovodnog ekosustava, tulari i makrofiti, pokazat će povišenu razinu stresa u eksperimentalnim uzorcima pod utjecajem pojedinog stresora, kao i u uzorcima koji su pod utjecajem kombinacije stresora u odnosu na kontrolne uzorke;
- iii) sastav mikrobne zajednice obraštaja i struktura metabolita obraštaja izmijenit će se u uzorcima izloženim (višestrukim) stresorima (farmaceuticima i presušivanju) u odnosu na kontrolne uzorke.

S ciljem ostvarenja navedenih ciljeva i testiranja glavnih hipoteza ovog rada, najprije je razvijena analitička metoda koja je omogućila istovremenu kvantifikaciju stresora i praćenje molekularnih odgovora slatkovodnih organizama na izloženost stresorima. Metoda se temelji na ekstrakciji otapalom uz dodatno pročišćavanje ekstrakcijom u čvrstoj fazi, dok je za identifikaciju i kvantifikaciju farmaceutski aktivnih spojeva, endokrinih modulatora te metabolita prisutnih u tkivima korišten spregnuti sustav kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) – spektrometrija masa. Identifikacija i kvantifikacija mikroplastike provedena je korištenjem stereo lupe i μ RAMAN spektrometrije. Djelovanje višestrukog stresa na različite sastavnice slatkovodnog ekosustava ispitano je u pojednostavljenim modelima slatkovodnih ekosustava, odnosno u sustavu umjetnih tekućica i u mezokozmos pokusu. Za praćenje utjecaja stresora i molekularnih odgovora organizama (tulara i makrofita) korištena je prethodno razvijena analitička metoda, dok su promjene u ranolikosti i strukturi obraštaja (mikrobne zajednice) pod utjecajem (višestrukih) stresora analizirane sekvenciranjem hipervarijabilne regije gena koji kodira za 16S rRNA. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) određen je broj kopija odabranih gena odgovornih za bakterijsku otpornost na antibiotike i onečišćenje okoliša. Statističku analizu dobivenih rezultata proveli smo korištenjem osnovnih statističkih testova poput analize varijance (ANOVA) te multivarijatnih statističkih metoda.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Važnost razvoja metode za istovremeno praćenje molekularnih odgovora na stres

Uslijed sve veće osviještenosti o negativnim učincima velikog broja onečišćivala na ekosustave, a time i na ljude, raste i potreba za razvojem učinkovite metode za njihovu analizu (Holt, 2000; Salem i sur., 2016). Analiza metabolita iz okolišnih uzoraka u najvećoj mjeri ovisi o strukturi uzorka (tekućina/krutina). U slučaju tekućih uzoraka najčešće se upotrebljava direktna analiza spektrometrijom masa. Takav način omogućuje najmanji gubitak metabolita, ali s druge strane zbog velikog udjela soli i/ili proteina detekcija može biti otežana (Álvarez-Sánchez i sur., 2010). Dodatno pročišćavanje uzoraka prije analize moguće je provesti filtriranjem kroz membranske filtre ili korištenjem kolona za ekstrakciju u čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction* – SPE). S druge strane, neposredno prije analize uzorci u krutom stanju u pravilu se homogeniziraju korištenjem tarionika, vibracijskog mlina ili ultrasonične probe. Međutim, zbog kompleksnosti krutih uzoraka, preporučuje se optimizirati protokole kako bi se spriječila modifikacija metabolita (Álvarez-Sánchez i sur., 2010; Bonino i sur., 2003).

Osim metabolita, i proteini mogu biti odlični pokazatelji stresa. Za izolaciju ukupnih proteina koriste se tri uvriježene metode: metoda po Bradfordu, Lowryu i Smithu (Goldring, 2019). Najčešće korištena metoda je metoda po Bradfordu, koja omogućuje prilagodbu protokola ovisno o tipu uzorka te potrebama istraživanja (Goldring, 2019; Wu i sur., 2011).

Metode izolacije i identifikacije plastike još su uvijek u ranom stadiju razvoja. Izdvajanje mikroplastike iz okolišnih uzoraka najčešće se provodi odvajanjem prema težini – otapanjem uzorka u zasićenim otopinama soli ili razgradnjom tkiva uz pomoć enzima, vodikovog peroksida i/ili kiselina (Bessa i sur., 2018; Cole i sur., 2014; Courtene-Jones i sur., 2017). Međutim, detekcija i identifikacija tipova plastike vrlo je dugotrajan i zahtjevan proces, a najčešće se provodi snimanjem infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom (FT-IR) ili Ramanovom spektroskopijom (Bellasi i sur., 2020; Blair i sur., 2017; Sighicelli i sur., 2018).

Do danas su razvijene brojne metode za izolaciju i detekciju farmaceutika i endokrinih modulatora iz biljnih i životinjskih tkiva upotrebom spregnutog sustava tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) - spektrometrija masa (Afonso-Olivares i sur., 2016; Alvarez-Muñoz i sur., 2015; Azzouz i sur., 2011; Huerta i sur., 2015; Omar i sur., 2016; Paíga i sur., 2017; Santos i Ramos, 2016). Iako su dostupne metode osjetljive i precizne u određivanju ciljanih spojeva iz okolišnih uzoraka, one su specijalizirane za izolaciju i detekciju samo pojedinih skupina spojeva. Također, takve metode omogućuju provedbu samo jedne ciljane analize (npr. isključivo kvantifikacije spojeva u uzorku).

Za dobivanje šire slike utjecaja onečišćivala na organizme potrebno je detektirati stresore te pratiti promjene u organizmima na što više različitih razina (npr. akumulacija spojeva u tkivima, produkcija proteina, metaboličke promjene i sl.). Prema dostupnim metodama, takva sveobuhvatna analiza zahtijeva veću količinu uzorka te duže vrijeme za pripremu samih uzoraka. Količina uzorka može biti ograničavajući faktor u slučaju kada se istraživanje provodi na vrlo malim organizmima (npr. vodeni beskralježnjaci) ili kada npr. zbog sezonske dinamike ili malih populacija nije moguće prikupiti dovoljnu količinu tkiva. Razvoj metode koja bi omogućila provođenje višestrukih analiza iz jednog uzorka smanjila bi eksperimentalne varijacije, vrijeme potrebno za obradu uzoraka te na koncu i troškove provedbe analitičkih analiza.

2.2. Farmaceutici i endokrini modulatori u slatkovodnim ekosustavima

Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika i endokrinih modulatora, koja uvjetuju brzinu njihove razgradnje ili transformacije te sedimentacije, igraju važnu ulogu u njihovoj dostupnosti slatkovodnim organizmima (Carstens i sur., 2013; Koba i sur., 2018; Veach i Bernot, 2011). Neki farmaceutici, poput veterinarskog antibiotika sulfametazina, pokazuju visoku stopu vezanja na sediment, što može predstavljati ozbiljnu ugrozu za jednostanične i višestanične bentoske slatkovodne organizme (Carstens i sur., 2013). Bioakumulacija farmaceutika i endokrinih modulatora uočena je u različitim skupina vodenih organizama na svim trofičkim razinama (Previšić i sur., 2021). Unos spojeva iz onečišćenog okoliša u vodene organizme može se odvijati preko površine tijela, disanjem te putem hranjenja (Arnot i Gobas, 2006; Previšić i sur., 2021). Negativni utjecaji zabilježeni su na različitim razinama organizacije, od fizioloških učinaka u

jedinkama (npr. nastanak upalnih procesa u probavnim žlijezdama školjkaša *Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819; Yuan i sur., 2023), preko učinaka na razini populacija (npr. pojavljivanje ženskih spolnih obilježja u mužjaka ribe *Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758 izloženim kontracepcijskim hormonima iz otpadne vode; Jobling i sur., 2006), do razine zajednica (npr. promjene u strukturi zajednice makroskopskih beskralježnjaka uslijed smanjene reprodukcije i povećane smrtnosti; Muñoz i sur., 2016). Brojna istraživanja su pokazala da obraštaj ima veliki potencijal za unos farmaceutika u organski matriks i stanice, uslijed čega može doći do pojave otpornosti bakterija na antibiotike (Bhattacharya i sur., 2010; Carles i sur., 2019). Dugotrajna izloženost obraštaja farmaceuticima može dovesti do promjena u mikrobnj zajednici, smanjujući rast autotrofne komponente te posljedično uzrokovati promjene mikrouvjeta u okolišu (Aubertheau i sur., 2017; Ricart i sur., 2010; Rosi-Marshall i sur., 2013). Osim izmjene obraštaja uslijed izlaganja farmaceuticima, zabilježena je i transformacija te razgradnja farmaceutski aktivnih tvari od strane najzastupljenijih komponenti obraštaja (bakterije, alge i gljive) (Della Greca i sur., 2008; Huerta i sur., 2016). S obzirom na široku rasprostranjenost obraštaja te mogućnost praćenja njegove kronične izloženosti okolišnim utjecajima kroz dulje vremensko razdoblje, smatra se da obraštaj može služiti kao dobar pokazatelj stanja okoliša (Huerta i sur., 2016). Međutim, gotovo u potpunosti izostaju istraživanja utjecaja onečišćivala na promjene u izvanstaničnom metabolizmu obraštaja, iako su bakterije, kao važna komponenta obraštaja, u bliskoj vezi s kemizmom vodenog medija (Smith i sur., 2019).

S druge strane, istraživanja koja prate akumulaciju i utjecaje farmaceutika na biljke vrlo su slabo zastupljena (Previšić i sur., 2021). Fu i sur. (2017) pratili su akumulaciju i transformaciju lijeka protiv upalnih procesa (diklofenak) u biljnom tkivu. Uočili su da diklofenak prolazi kroz niz metaboličkih transformacija čime se postiže detoksifikacija spoja. Međutim, za razliku od životinja, biljke unesene spojeve ne izlučuju iz organizma, što predstavlja veliki rizik za prenošenje farmaceutika u biljojede te dalje kroz hranidbenu mrežu (Fu i sur., 2017, 2016; Wu i sur., 2014). Previšić i sur. (2021) po prvi put su uočili visoku korelaciju između akumulacije farmaceutika iz vode u mahovini te akumulacije u herbivornim ličinkama kukaca. Ovaj nalaz ukazuje na prijenos farmaceutika iz mahovine u ličinke vodenih kukaca putem hranjenja (Previšić i sur., 2021). Uslijed specifičnog životnog ciklusa koji povezuje vodene i kopnene hranidbene mreže, vodeni kukci mogu biti vektori u prijenosu onečišćivala, uključujući farmaceutike i endokrine modulatore, iz vodenog u kopneni ekosustav (Previšić i sur., 2021b; Veseli i sur., 2022).

Istraživanja o utjecajima farmaceutika na životinje široko su zastupljena, osobito istraživanja provedena na ribama (Fent i sur., 2006; Giovanni i sur., 2001; Laville i sur., 2004; Sanchez i sur., 2011). Zabilježen je široki spektar posljedica dugoročne izloženosti farmaceuticima, koje prate poremećaji u fiziološkim procesima, kao što je detoksifikacija toksičnih spojeva, povišen oksidativni stres, poremećaji u mehanizmima regulacije hormona te reprodukciji (Fent i sur., 2006). Većina farmaceutika najčešće zabilježenih u slatkovodnim ekosustavima ne uzrokuje značajan toksikološki odgovor u makroskopskih beskralježnjaka kada su izloženi koncentracijama koje su na gornjoj granici koncentracija zabilježenih u okolišu, odnosno okolišno relevantnim koncentracijama (Dussault i sur., 2008). Bundschuh i sur. (2016) pokazali su da sulfonamidni antibiotici ne uzrokuju akutnu toksičnost u vodenih beskralježnjaka, čak ni kada su životinje izložene visokim koncentracijama ($1.000 \mu\text{g L}^{-1}$), dok antiparazitici (benzimidazoli) pokazuju srednju do visoku toksičnost. Takvi rezultati vjerojatno su posljedica izravnog djelovanja antiparazitika na proteine (Bundschuh i sur., 2016). Zabilježeno je da antidepresiv (fluoksetin) negativno utječe na rast i reprodukciju, unutarstanične signalne putove, kognitivnu funkciju te aktivnost makroskopskih beskralježnjaka (Brooks i sur., 2003; Shaliutina-Kolešová i sur., 2020). Međutim, iako su istraživanja na makroskopskim beskralježnjacima u porastu, izostaju istraživanja koja u kontroliranim laboratorijskim uvjetima prate utjecaje farmaceutika u kombinaciji s najčešćim prirodnim ili drugim antropogenim stresorima.

2.3. Mikroplastika u slatkovodnim ekosustavima

Uočeno je da mikroplastika može služiti kao podloga za razvoj obraštaja (Miao i sur., 2021; Semcesen i Wells, 2021). Međutim, istraživanja pokazuju da se sastav obraštajane zajednice na mikroplastici znatno razlikuje od one na prirodnom supstratu. U mikrobnoj zajednici obraštaja razvijenoj na mikroplastici zabilježena je povećana zastupljenost bakterija koje posjeduju gene za otporost na antibiotike. Zato mikroplastika može služiti kao vektor za rasprostranjivanje bakterija koje mogu biti potencijalno patogene unutar slatkovodnih ekosustava (Huang i sur., 2021; Song i sur., 2020). Razvoj obraštaja na česticama mikroplastike koje plutaju utječe na njihovo postepeno tonjenje te pritom postaju dostupnije bentoskim organizmima (Krause i sur., 2021).

Istraživanja o utjecaju mikroplastike na vodene biljke su malobrojna, ali ukazuju na izostanak odgovora biljaka čak i kada su izložene vrlo visokim koncentracijama mikroplastike (50.000 čestica mikroplastike mL⁻¹) (Kukkola i sur., 2021; Mateos-Cárdenas i sur., 2020). Rozman i sur. (2022) pratili su utjecaj dugoročne izloženosti vodene leće (*Lemna minor* Linnaeus, 1753) okolišno značajnoj koncentraciji mikroplastike (960, 4.800 i 9.600 čestica mikroplastike L⁻¹). Rezultati istraživanja pokazali su povišenu razinu stresa na samom početku pokusa koji se očitovao povišenjem oksidativnog stresa, ukupne koncentracije proteina i smanjenjem rasta korijenja. Međutim, s vremenom su odgovori na stres slabili, što ukazuje na sposobnost aklimatizacije vodene leće na onečišćenje mikroplastikom (Rozman i sur., 2022). Također, uočeno je da vodena leća zadržava čestice mikroplastike na svojoj površini, što može predstavljati problem zbog potencijalnog prenošenja čestica kroz hranidbeni lanac, ali ujedno otvara mogućnost korištenja vodene leće u procesu bioremedijacije (Mateos-Cárdenas i sur., 2019; Rozman i sur., 2022; Rozman i Kalčíková, 2022). Za razliku od biljaka, fototrofne alge pokazuju veću osjetljivost na izloženost mikroplastici, koja se očituje u vidu snižene koncentracije klorofila u stanicama (Wang i sur., 2019).

U morskim i slatkovodnim ekosustavima mikroplastika je zabilježena na gotovo svim trofičkim razinama (Bellasi i sur., 2021; Teuten i sur., 2007). Uočeno je da čestice mikroplastike na dva načina mogu ući u slatkovodne životinje: hranjenjem i disanjem, ali njihov toksikološki učinak i dalje nije u potpunosti razjašnjen (Bellasi i sur., 2020). Istraživanja utjecaja mikroplastike na bentoske beskralježnjake poput ličinki vodenih kukaca do danas su malobrojna, ali su istovremeno od velikog značaja. U odraslom obliku, vodeni kukci predstavljaju važan izvor hrane za kopnene predatore, pri čemu postoji opasnost od prenošenja mikroplastike iz vodenog u kopneni ekosustav (Eerkes-Medrano i sur., 2015). Također, mikroplastika većim dijelom završava na dnu vodenih ekosustava, postajući sastavnim dijelom sedimenta na kojem bentoski organizmi uglavnom obitavaju (Bellasi i sur., 2020). Istraživanja potvrđuju da unos mikroplastike putem prehrane utječe na izmjenu u režimu hranjenja, što se negativno odražava na razinu energije, rast, razvoj i reprodukciju vodenih organizama (Bellasi i sur., 2020; Jemec i sur., 2016; Jeong i sur., 2016; Straub i sur., 2017). Prisutnost mikroplastike zabilježena je u probavnom sustavu brojnih životinja, ali vrlo sitne čestice pronađene su i u tkivima riba poput škrga, mišića, jetre i mozga (Ding i sur., 2018). Međutim, način njihova ulaska te utjecaj na okolno tkivo, kao i na organizam u cjelini, i dalje nije razjašnjen (Bellasi i sur., 2020).

S obzirom da je mikroplastika sastavni dio suvremenog života, istraživanja o njezinom rasprostranjivanju, utjecajima na organizme te interakciji mikro- i nano- plastike s drugim stresorima ključna su za stjecanje znanja koja omogućuju umanjivanje potencijalnih rizika, s ciljem održivog upravljanja slatkovodnim ekosustavima.

2.4. Utjecaji višestrukih stresora na slatkovodne organizme

Djelovanje višestrukog stresa na organizme važno je pratiti na nekoliko molekularnih razina upravo zbog složenosti interakcija između pojedinih stresora te interakcija stresora s organizmima. Najveći broj istraživanja koja prate utjecaj višestrukih stresora proveden je na obraštaju i vodenim beskralježnjacima (Romero i sur., 2020, 2018; Urbanič i sur., 2020). S obzirom da je obraštaj sveprisutna komponenta slatkovodnih ekosustava, vrlo je često izložen utjecajima klimatskih promjena i antropogenog zagađenja (Battin i sur., 2016; Corcoll i sur., 2015; Kattwinkel i sur., 2011; Romero i sur., 2020). Provedena istraživanja pokazuju da presušivanje toka može utjecati na smanjenu otpornost obraštaja na kemijska onečišćenja (Romero i sur., 2020, 2018). Romero i sur. (2020, 2018) pokazali su da se obraštaj najdrastičnije mijenja nakon presušivanja toka, zatim povišenjem temperature te naposljetku pod utjecajem pesticida i antibiotika. Obraštaj izložen presušivanju postaje tanak te sadrži manje zalihe energije koju može uložiti u mehanizam obrane od stresa, što ga na koncu čini izloženijim i osjetljivijim na kemijski stres (Romero i sur., 2020, 2018). S druge strane, Corcoll i sur. (2015) zabilježili su da glavne komponente obraštaja (bakterije i alge) različito reagiraju na kombinaciju hidrološkog i kemijskog stresa. Nakon izlaganja suši, bakterije iz obraštajne zajednice pokazuju povećanu otpornost na izloženost farmaceuticima, dok alge nakon izlaganja presušivanju postaju osjetljivije na izloženost farmaceuticima. Ovakvi rezultati ukazuju na opasnost od promjene strukture slatkovodnog obraštaja prilikom izmjene hidrološkog režima u onečišćenim vodenim tijelima, što dugoročno može dovesti do smanjivanja udjela algi i dominacije bakterijske komponente (Corcoll i sur., 2015).

U posljednjem desetljeću, u praćenju sastava i strukture obraštajnih zajednica, uz standardno DNA (deoksiribonukleinska kiselina) sekvenciranje koje obuhvaća ukupnu mikrobnu zajednicu (aktivnu, neaktivnu zajednicu i nedavno uginule svojte), provodi se i RNA (ribonukleinska kiselina) sekvenciranje koje omogućuje analizu isključivo aktivne komponente obraštajnih

zajednica (Gionchetta i sur., 2020), a time i bolje razumijevanje utjecaja okolišnih i kemijskih stresora na mikrobnu obraštajnu zajednicu (Gionchetta i sur., 2020; Romero i sur., 2020; Rosi-Marshall i sur., 2013). Nadalje, analiza proteoma i metaboloma obraštaja omogućuje praćenje biokemijskih obrazaca koji mogu služiti kao indikatori pojedinih oblika stresa u okolišu (Serra-Compte i sur., 2018b).

Većina dosadašnjih istraživanja na beskralježnjacima pratila je utjecaje različitih kombinacija prirodnih i antropogenih stresora (u različitim dozama) kroz bilježenje stope preživljavanja, promjene u parametrima životnog ciklusa te promjenama u strukturi zajednice vodenih beskralježnjaka (Cavallaro i sur., 2019; Heye i sur., 2019). Sagledavanje utjecaja višestrukog stresa u vodenim okolišima često je vezano uz promjene u okolišnim uvjetima uslijed razvoja poljoprivrede (Cavallaro i sur., 2019; Contardo-Jara i sur., 2011; Elbrecht i sur., 2016; Gebert i sur., 2022; Sun i sur., 2016; Velasco i sur., 2019), dok su istraživanja na farmaceuticima znatno rjeđa. Heye i sur. (2019) istraživali su toksičnost lijeka protiv epilepsije (karbamazepin) u kombinaciji s prirodnim stresorima i herbicidom na vodene beskralježnjake (Diptera: *Chironomus riparius* Meigen, 1803; Annelida: *Lumbriculus variegatus* Müller, 1774; Gastropoda: *Potamopyrgus antipodarum* Gray, 1843). Rezultati pokazuju značajno povećanje toksičnosti lijeka u kombinaciji s herbicidom. Povećana toksičnost posebno se negativno odrazila na reprodukciju puža vrste *P. antipodarum* te odgođeno izlijetanje jedinki trzalaca vrste *C. riparius*. Istraživanja višestrukog stresa na tularima slabo su zastupljena te prate utjecaje stresora kao što su: smanjena prozirnost vode, povećana brzina strujanja, povišena temperatura, povećana sedimentacija, pri čemu je u uvjetima višestrukog stresa uočeno smanjenje broja jedinki tulara (Beermann i sur., 2018) te povećan oksidativni stres (Amoatey i Baawain, 2019).

Mikroplastika u kontekstu višestrukih stresora proučava se tek posljednjih nekoliko godina (Han i sur., 2021; Kratina i sur., 2019; Razanajatovo i sur., 2018; Serra i sur., 2020; Silva i sur., 2022; Varg i sur., 2022). Istraživanja su usmjerena prema ispitivanju interakcija plastike s prirodnim stresorima, kao što su dostupnost hrane, promjena temperature, izloženost povišenom salinitetu i dr. te njihovom djelovanju na vodene beskralježnjake. Kratina i sur. (2019) uočili su aditivni učinak mikroplastike i povišene temperature na metabolizam rakušca vrste *Gammarus pulex* Linnaeus, 1758, iako sam učinak nije bio vidljiv u stopi hranjenja.

Navedena istraživanja pokazuju veliki potencijal molekularnih metoda u detekciji ranih posljedica stresa u okolišu te u otkrivanju biomarkera za izloženost pojedinim stresorima. Istraživanja koja sveobuhvatno sagledavaju odgovore na stres na nekoliko razina istovremeno, uzimajući u obzir interakcije između različitih organizama, iako iznimno malobrojna pružaju jasnu predodžbu o stvarnim odnosima i procesima u prirodi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Razvoj metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka

3.1.1. Kemikalije i reagensi

Korištena otapala (voda, acetonitril i metanol) bila su HPLC razine čistoće (Fisher Scientific, UK), dok su standardi farmaceutika i endokrinih modulatora s pripadajućim unutarnjim standardima bili su visoke razine čistoće ($> 90\%$) (Sigma Aldrich, SAD) (Tablica 1). Temeljne standardne otopine pojedinačnih analita pripremljene su otapanjem istih u metanolu u krajnjoj masenoj koncentraciji od 1.000 mg L^{-1} te su pohranjene na -80°C . Iz temeljnih standardnih otopina analita neposredno prije korištenja pripremljene su standardne otopine smjese u finalnoj koncentraciji (svakog pojedinog analita) od 6 mg L^{-1} . Za pročišćavanje supernatanata nakon provedene ekstrakcije korištene su kolone za ekstrakciju u čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction* - SPE) Oasis HLB i Oasis HLB Prime (Waters Corporation, SAD). Tipovi mikroplastike korišteni u svrhu testiranja metode navedeni su u Tablici 2. Korištene su komercijalne granule za proizvodnju plastičnih predmeta. Za razgradnju tkiva i organske tvari korištene su anorganske kiseline i vodikov peroksid visoke razine čistoće (potpoglavlje 3.1.7.). Za izdvajanje čestica mikroplastike iz razgrađenog tkiva korišteni su membranski filter papiri promjera 47 mm s veličinom pora $5 \mu\text{m}$ (Whatmana, SAD). Za određivanje ukupne koncentracije proteina korištene su svježe pripremljene otopine Tris-HCL pufera, uree i RapiGest SF (potpoglavlje 3.1.8.).

Tablica 1. Popis standarada i pripadajućih unutarnjih standarada (Sigma Aldrich, SAD) korištenih u razvoju metode za izolaciju onečišćivala iz okolišnih uzoraka.

spoj	upotreba spoja	unutarnji standard
paracetamol	anelgetik/protuupalni lijek	paracetamol D ₄
benzilparaben	konzervans	metilparaben D ₄
deksametazon	imunosupresiv/protuupalni lijek	deksametazon D ₄
diklofenac	anelgetik/protuupalni lijek	diklofenac ¹³ C ₆
etilparaben	konzervans	metilparaben D ₄
gemfibrozil	lijek za snižavanje kolesterola	gemfibrozil D ₆
hidroklorotiazid	diuretik	hydrochlorazide D ₂
ketoprofen	anelgetik/protuupalni lijek	ketoprofen D ₃
naproxen	anelgetik/protuupalni lijek	ibuprofen D ₃
1H benzotriazol	antiparazitik	1H benzotriazol D ₄
azaperol	sedativ	azaperone D ₄
azaperone	sedativ	azaperone D ₄
kofein	stimulator	kofein D ₃
karbamazepin	antiepileptik	karbamazepin D ₁₀
klopidogrel	antikoagulans	azaperon D ₄
difenilhidramin	antihistamin	difenilhidramin D ₃
epoksi karbamazepin	antiepileptik	karbamazepin D ₁₀
met benzotriazol	antiparazitik	1H benzotriazol D ₄
propanolol	beta bloker	azaperon D ₄
ranitidin	lijek za neutraliziranje želučane kiseline	karbamazepin D ₁₀
sertralin	antidepresiv	trifenilfosfat D ₁₅
sotalol	antiaritmik	azaperon D ₄
trisbutoksi fosfat	usporivač plamena	trifenilfosfat D ₁₅
triskloroizopropil fosfat	usporivač plamena	trifenilfosfat D ₁₅
tiebendazol	konzervans	azaperon D ₄

Tablica 2. Popis tipova mikroplastike korištenih u razvoju metode za istovremenu izolaciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka te u laboratorijskom pokusu na vodenim beskralježnjacima i mahovini.

tip plastike	gustoća	veličina čestica
polipropilen (PP)	0,855 g cm ⁻³	100-500 μm
polietilen visoke gustoće (HDPE)	0,93 - 0,97 g cm ⁻³	100-500 μm
polietilen niske gustoće (LDPE)	0,91 – 0,94 g cm ⁻³	100-500 μm
polistiren (PS)	1,02 g cm ⁻³	100-500

3.1.2. Prikupljanje uzoraka

U ovom istraživanju korištena su tkiva vodenih organizama koji se uzorkuju i koriste u redovnom monitoringu stanja slatkovodnih ekosustava. Uzorci su prikupljeni s četiri lokacije u Hrvatskoj:

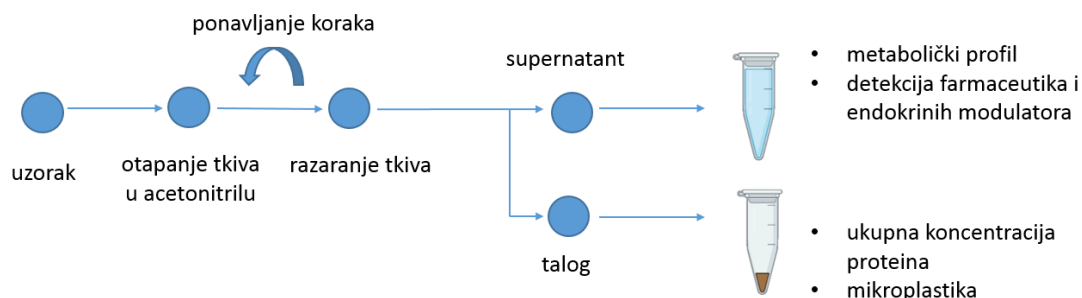
1. Krčić (izvorišni tok rijeke Krčića; N44,026787 E16,333054) – ličinke tulara (*Micropterna nycterobia* McLachlan, 1875, Trichoptera) te mahovina (*Cinclidotus aquaticus* (Hedw.) Bruch i Schimper, 1842 i *Rhynchostegium riparioides* (Hedw. Cardot, 1913, Briophyta)
2. Sutla (rijeka Sutla 500 m nizvodno od grada Klanjca; N46,040660 E15,729664) rakušci (*Gammarus* sp., Amphipoda),
3. Prelog (obodni kanal akumulacije Dubrava; N46,323477 E16,634145) – odrasli tulari (*Silo* sp., Trichoptera),
4. Krapina (rijeka Krapina u mjestu Kupljenovo; N45,934457 E15,818039) – ličinke (*Gomphus* sp., Anisoptera, Odonata) i odrasle jединke vretenaca (*Calopteryx splendens*, Harris, 1782, Zygoptera, Odonata) te obraštaj.

Uzorci obraštaja prikupljeni su struganjem s kamenja uz pomoć četkice, odrasli kukci prikupljeni su entomološkom mrežicom, ličinke vodenih kukaca prikupljene su uz pomoć kracera, dok su uzorci mahovine prikupljeni ručno, skidanjem sa sedrenih barijera. Uzorci su pohranjeni u plastične posude od 100 mL. Ličinke kukaca transportirane su žive u vodenom mediju uz održavanje temperature rijeke u kojoj su prikupljene, dok su ostali uzorci prilikom transporta pohranjeni na 4 °C. U laboratoriju su svi uzorci pohranjeni na –80 °C do daljnje obrade.

3.1.3. Priprema i obrada uzoraka

Uzorci beskralježnjaka samljeveni su u vibracijskom mlinu, uzorci mahovine usitnjeni su uz pomoć tarionika i tekućeg dušika, dok uzorci obraštaja nisu dodatno obrađeni. U Eppendorf tubice od 2 mL odvagano je 30 mg homogeniziranog tkiva za svaki pojedini uzorak tkiva (ličinački i odrasli stadij vretenaca i tulara, rakušci, mahovina i obraštaj). Kako bi se postiglo odjeljivanje proteina taloženjem, uzorak je otopljen u 1,5 mL prethodno ohlađenog acetonitrila nakon čega je na tresilici (IKA® Vortex Genius 3, Njemačka) miješan 10 min. Taloženje proteina pospješeno je odlaganjem uzorka na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 min i centrifugiranjem na $20.000 \times g$ (CENTRIC 200R, Tehnica, Slovenija) u trajanju od 10 min. Odvojeni supernatant prebačen je u novu tubicu, dok je talog ponovno otopljen u 1,5 mL hladnog acetonitrila te je tkivo dodatno razgrađeno korištenjem ultrasonične probe u trajanju od 1 min na 50% intenziteta. Nakon toga, uzorci su ponovno promiješani 5 min na tresilici u trajanju od 5 min, ostavljeni 10 min na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i centrifugirani 10 min na $20.000 \times g$ kako bi se supernatant odvojio od taloga. Supernatanti i talozi osušeni su na uparivaču (Labconco-CentriVap concentrator, USA) (Slika 1, Slika 2b).

U svaki uzorak nakon odvage, dodano je po 20 čestica svakog od četiri korištena tipa plastike (Tablica 2) kako bi se mogla pratiti efikasnost izolacije mikroplastike prilikom obrade uzorka. Također, u svaki uzorak dodano je 10 μL smjese izotopno obilježenih standarada (unutarnji standard; Tablica 1) koncentracije 3 mg L^{-1} te je u polovicu uzorka dodano 10 μL smjese unutarnjih standarada iste koncentracije (Tablica 1). U preostale uzorke neposredno prije analize na spektrometriji masa dodan je isti volumen smjese unutarnjih standarada.



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz protokola za izolaciju onečišćivala, metabolita i proteina iz jednog uzorka tkiva.

3.1.4. Pročišćavanje uzoraka

Osušeni supernatanti otopljeni su u 1,5 mL vode te miješani na srednjoj brzini 20 min. Nakon toga uzorci su pročišćeni na Oasis HLB i Oasis HLB Prime kolonama. Oasis HLB kolone zahtijevaju predkondicioniranje nanošenjem 1 mL acetonitrila i 1 mL vode nakon čega se nanosi uzorak, dok Oasis HLB Prime omogućuju pročišćavanje uzoraka bez prethodnih koraka. Kolone su postavljene na vakumski ekstraktor (Slika 2a). Nakon nanošenja uzoraka, kolona je pročišćena nanošenjem 1 mL vode te je uzorak ispran s kolone u čistu tubicu dodavanjem 1,5 mL acetonitrila. Brzina prolaska uzorka kroz kolonu iznosila je oko $1 \mu\text{L s}^{-1}$. Pročišćeni uzorci zatim su osušeni na uparivaču (Slika 2b). Neposredno prije analize na spektrometru masa LTQ-Orbitrap VelosTM (Thermo Fisher Scientific, USA) (Slika 2c) uzorci su otopljeni u 0,3 mL 50% metanola.

3.1.5. Analiza spojeva spektrometrom masa

Koncentracije ciljanih spojeva određene su tzv. ciljnom (eng. *target*) metodom koristeći spregnuti sustava tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (Waters Acquity Ultra-PerformanceTM, Waters, UK) - spektrometrija masa četveropolne linearne ionske stupice (UPLC–QqLIT) (Applied Biosystems, USA) (Slika 2c). Pokretne faze korištene za UPLC razdvajanje u pozitivnom modu bile su metanol (pokretna faza A) i voda (pokretna faza B), dok su u negativnom modu korišteni: acetonitril (pokretna faza A) i 5 mM amonijev acetat pH 9 (pokretna faza B). Praćena su dva najintenzivnija fragmentna iona za ciljne spojeve pri čemu je prvi fragmentni ion

korišten za kvantificiranje spoja, dok je drugi ion služio kao potvrda identiteta spoja. Za svaki pojedini spoj dodan je i unutarnji standard poznate koncentracije koji je prolazio kroz faze pripreme i analize kao i ciljani spoj, što je omogućavalo nadoknađivanje eventualnih gubitaka spoja tijekom pripreme uzorka (Ho i sur., 2003). Određivanje koncentracije ciljanog spoja ostvaruje se na temelju omjera površina signala ciljanog spoja i unutarnjeg standarda korištenjem umjerne krivulje.



Slika 2. a) Oasis HLB Prime kolone postavljene na vakuumski ekstraktor, b) sušenje supernatanata na uparivaču c) analiza uzoraka masenom spektrometrijom.

3.1.6. Utjecaj matrice i iskoristivost metode

Dodavanje standarada prije i nakon obrade uzoraka omogućilo je procjenu učinkovitosti ekstrakcije onečišćivala izračunavanjem tzv. utjecaja matrice (eng. *matrix effect*) te iskoristivosti metode (eng. *recovery rate*). Također, analizirana je i umjerna krivulja mjerenjem različitih koncentracija spojeva otopljenih u 50% metanolu, što je omogućilo određivanje koncentracije ciljanih spojeva u uzorcima te računanje utjecaja matrice.

Iskoristivost (R%) je izračunata usporedbom uzoraka u kojima je smjesa standarada dodana prije obrade uzoraka, s uzorcima u kojima su standardi dodani neposredno prije analize, prema formuli:

$$R\% = 100 * \frac{A}{C - B}$$

Utjecaj matrice (ME%) računao se usporedbom površina signala ciljanog spoja u različitim okolišnim uzorcima s površinom signala spoja otopljenog u 50% metanolu prema navedenoj formuli:

$$ME\% = 100 \left(1 - \frac{C - B}{D} \right)$$

gdje je:

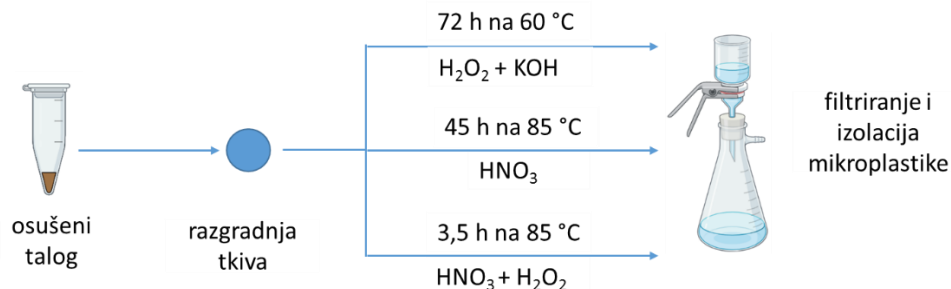
- R% – stupanj iskoristivosti metode izražen u %
- A – standardi dodani u uzorke prije obrade
- B – slijepa proba
- C – koncentracija spoja dodana neposredno prije analize
- D – standard otopljen u 50% metanolu
- ME% – utjecaj matrice izražen u %

3.1.7. Učinkovitost izolacije mikroplastike u različitim okolišnim uzorcima

Iz taloga dobivenih odvajanjem supernatanata testirana je učinkovitost izolacije mikroplastike iz okolišnih uzoraka. Testirana su tri protokola za razgradnju tkiva (Slika 3):

- i) dodati 0,2 mL 30% H₂O₂ i 0,2 mL 4% KOH. Ostaviti 72 h na temperaturi od 60 °C. Nakon 72 h dodati 0,06 mL 68% HClO₄ i 0,26 mL 65% HNO₃. Pričekati 3 min, a zatim otopinu razrijediti toplom vodom, promiješati i filtrirati;
- ii) dodati 1 mL 30% HNO₃ te smjesu ostaviti na 85 °C tijekom 45 h. Ohlađene uzorke promiješati, otopinu neutralizirati dodavanjem 30% NaOH te ju filtrirati;
- iii) dodati 0,75 mL 65% HNO₃ i 0,35 mL 30% H₂O₂ te ostaviti 3,5 h na 85 °C. Nakon što se otopina ohladi, uzorke promiješati i filtrirati.

Procjena potencijalnog gubitka mikroplastike uslijed izlaganja kiselinu postignut je vaganjem plastičnih komadića prije i nakon provođenja svakog od navedena tri protokola. Nakon razgradnje tkiva uzorci su filtrirani Milipore sustavom za filtraciju korištenjem membranskih filter papira promjera 47 mm i veličine pora 5 µm (Whatman, SAD). Filter papiri su pregledani na stereo lupi, a čestice mikroplastike su identificirane korištenjem µRAMAN spektroskopije (Horiba Jobin Yvon T64000).



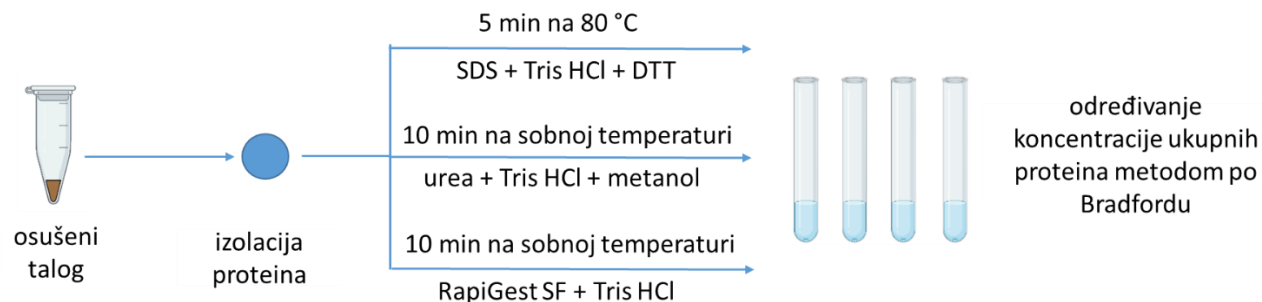
Slika 3. Pojednostavljeni prikaz protokola za razgradnju tkiva u svrhu izolacije mikroplastike iz uzoraka tkiva.

3.1.8. Učinkovitost izolacije proteina korištenjem različitih surfaktanata

Korištenjem homogeniziranog tkiva ličinki tulara testirana je učinkovitost izolacije proteina uz upotrebu tri surfaktanta (površinski aktivna tvar): natrijev dodecil-sulfat (SDS), urea, RapiGest SF (Waters, SAD) prema protokolima (Slika 4):

- i) 0,13 M Tris HCl (pH = 6,8), 2% SDS, 16% glicerol, 0,59% DTT (ditiotreitol); dodati 200 μ L zagrijanog pufera (80 °C) u uzorak tkiva, staviti 5 min na 80 °C, centrifugirati 15 min na 4 °C;
- ii) 50 mM Tris HCl (pH = 8,0), 5 M urea, 1% metanola; dodati 200 μ L u uzorak tkiva, inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi i centrifugirati 5 min na 4 °C;
- iii) RapiGest SF 0,1% u 50 mM Tris HCl (pH = 8,0); dodati 200 μ L u uzorak tkiva, ostaviti 10 min na sobnoj temperaturi, centrifugirati 10 min na 4 °C.

Ukupna koncentracija izoliranih proteina određena je metodom po Bradfordu te je izražena kao udio izoliranih proteina u masi suhog tkiva (mg g^{-1}) (Bradford, 1976). Svaki uzorak je mjereno u triplicatu, a kao standard korišten je goveđi serum albumin (BSA, eng. *bovine serum albumin*). Za određivanje koncentracije proteina korištene su čiste staklene epruvete te je mjerenje koncentracije provedeno u staklenoj kiveti na UV-vis spektrofotometru (BioDrop Duo+, UK). Priprema uzoraka za analizu: 1 mL Bradfordovog reagensa (sastav: 50 mg kromatske plave boje otopljene u 50 mL metanola, 100 mL 85% H_3PO_4 , 850 mL vode), 97 μ L MiliQ vode, 3 μ L razrijeđenog uzorka. Provjera učinkovitosti izolacije napravljena je elektroforezom na 10% SDS-PAGE gelu.



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz protokola za izolaciju proteina korištenjem različitih surfaktanata. SDS – natrijev dodecil-sulfat, DTT – ditiotritol.

3.1.9. Statistička obrada podataka

Podaci utjecaja matrice te iskoristivost metode nisu postigli normalnu raspodjelu ni nakon provedenih transformacija zbog čega je testiranje razlika između različitih tipova tkiva i razlika između korištenih spojeva provedeno korištenjem neparametrijskog Kruskal-Wallis testa. Razlika između utjecaja matrice te iskoristivosti između Oasis HLB i Oasis HLB Prime SPE kolona testirana je neparametrijskim Mann-Whitney testom. Koncentracija proteina te koncentracija čestica nakon razgradnje tkiva postigla je normalnu raspodjelu te je značajnost između tipova tkiva i tipova plastike testirana analizom varijance (ANOVA) s razinom značajnosti $p < 0,05$. Razlike između različitih setova podataka testirane su Bonferroni post-hoc testom. Navedeni testovi provedeni su u programu IBM SPSS Statistics ver. 27.0 (Corp, 2020).

3.2. Istraživanje utjecaja mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora na strukturu metaboloma i proteoma mahovine i tulara

3.2.1. Kemikalije i reagensi

Voda, acetonitril i metanol bili su HPLC razine čistoće (Fisher Scientific, UK). Korišteni standardi i unutarnji standardi prikazani su u Tablici 3 te su bili visoke razine čistoće ($> 90\%$) (Sigma Aldrich, SAD). Za pročišćavanje supernatanata korištena je Oasis HLB Prime kolona za

ekstrakciju u čvrstoj fazi. Tipovi mikroplastike korišteni kao tretman u pokusu navedeni su u Tablici 2. Za razgradnju tkiva prilikom izolacije mikroplastike iz uzoraka mahovine i tulara korišten je 30% H₂O₂ i HNO₃ visoke razine čistoće. Za izdvajanje mikroplastike iz razgrađenih uzoraka korišteni su membranski filter papiri promjera 47 mm s veličinom pora 5µm (Whatmana, SAD). Ekstrakcija proteina provedena je korištenjem svježe pripremljenih otopina Tris HCl pufera i surfaktanta RapiGest SF.

Tablica 3. Popis standarada i unutarnjih standarada korištenih u laboratorijskom pokusu na vodenim beskralježnjacima i mahovini.

spoj	upotreba spoja	unutarnji standard
1H benzotriazol	antiparazitik	1H benzotriazol D ₄
bisfenol A	plastifikator	bisfenol A D ₃
kofein	stimulator	kofein D ₃
gemfibrozil	lijek za snižavanje kolesterola	gemfibrozil D ₆
ketoprofen	analgetik/protuupalni lijek	ketoprofen D ₃
metilparaben	konzervans	metilparaben D ₄
estriol	pseudohormon	17β-estradiol-2,4 D ₄
difenilhidramin	antihistaminik	difenilhidramin D ₃
triskloroizopropil fosfat	usporivač plamena	trifenilfosfat D ₁₅

3.2.2. Prikupljanje uzoraka i provođenje pokusa

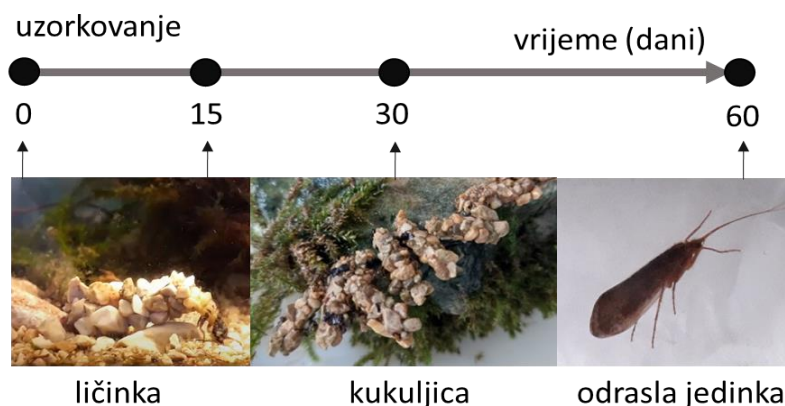
Laboratorijski pokus na tularima i mahovini proveden je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Uzorci korišteni u pokusu prikupljeni su na rijeci Krčić koja je minimalno antropogeno utjecana (Grgić i sur., 2022). Prikupljeni su uzorci: vode, sedimenta i kamenja, mahovine (vrste *C. aquaticus* i *Rh. riparioides*) i ličinki tulara (vrsta *M. nicteroibia*). U laboratoriju, unutar tri inkubatora (POL-EKO APARATURA, Poli), raspoređeno je 15 akvarija, koji su predstavljali mezokozmose. Svaki mezokozmos (dimenzija 30 × 20 × 15 cm) sadržavao je 3 L vode, 150 g sedimenta, jedan veći kamen, busen mahovine te 30 ličinki tulara (Slika 5). Početna temperatura u inkubatorima postavljena je na 9,5 °C te je svakih 15 dana temperatura povišena za 0,5 °C, kako bi se simulirao prirodni temperaturni režim rijeke Krčić. Svaki

mezokozmos prozračivan je uz pomoć kamena za prozračivanje i pumpe za zrak. Akvariji su bili prekriveni staklenim pokrovima kako bi se smanjilo isparavanje vode. Količina vode u akvarijima održavana je konstantnom tako da se udio isparene vode nadomjestio dekloriranom vodovodnom vodom. Akvariji su aklimatizirani tjedan dana, nakon čega se započelo s tretmanima. Tri akvarija su predstavljala kontrolu, dok su ostali izlagani sljedećim tretmanima: i) smjesa mikroplastike (Tablica 2); ii) smjesa farmaceutika i endokrinih modulatora (Tablica 3); iii) kombinacija mikroplastike, farmaceutika i edokrinih modulatora (Tablica 2 i 3) (Slika 5). Koncentracije spojeva u tretiranim mezokozmosima bile su 500 ng L^{-1} te su dnevno dodavane u akvarije kako bi se postigle pseudokonstantne koncentracije spojeva s obzirom da se navedeni relativno brzo raspadaju. S druge strane, koncentracija svake pojedine vrste čestica mikroplastike u sustavu je bila $2.000 \text{ čestica L}^{-1}$ (ukupno u mezokozmosu 6.000 čestica) koje su dodane jednom na početku pokusa.

Inkubator 1	Inkubator 2	Inkubator 3	
kontrola	mikroplastika	spojevi + mikroplastika	
spojevi	spojevi + mikroplastika	mikroplastika	
mikroplastika	kontrola	spojevi + mikroplastika	
spojevi + mikroplastika	spojevi	spojevi	
spojevi	mikroplastika	kontrola	

Slika 5. Dizajn laboratorijskog pokusa na mahovini (*Cinclidotus aquaticus* i *Rhynchostegium riparioides*) i tularima (*Micropterna nycterobia*) s nasumičnim rasporedom tretmana: kontrola, spojevi (farmaceutici i endokrini modulatori), mikroplastika te kombinacija spojeva i mikroplastike.

Mahovina i tulari uzorkovani su u četiri vremenske točke nakon aklimatizacije – početni uzorak (0) – prije dodavanja tretmana, 15. dan, 30. dan te 60. dan pokusa, dok su odrasli tulari uzorkovani neposredno nakon izlijetanja (između 45. i 60. dana) (Slika 6) pomoću pincete, pri čemu su ličinke, predkukuljice i kukuljice uz pomoć dvije pincete izvađene iz kućica. Prilikom uzorkovanja replikati mahovine i tulara prikupljeni su iz svakog akvarija, nakon čega su združeni svi uzorci istog tretmana kako bi se smanjila varijabilnost među akvarijima. Iz svakog združenog uzorka, odvojeni su analitički replikati koji su analizirali. Kako bismo testirali količinu čestica mikroplastike koje svakodnevno prolaze kroz probavni sustav tulara, nakon uzorkovanja, polovica jedinki držana je 24 h u akvarijima s čistom vodom što im je omogućilo čišćenje probavnog sustava, dok je druga polovica tulara uzorkovana direktno. Sva prikupljena tkiva su zatim liofilizirana i pohranjena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje obrade.



Slika 6. Dinamika uzorkovanja jedinki tulara u različitim razvojnim stadijima (ličinke, kukuljice i odrasli) te mahovine u laboratorijskom pokusu.

3.2.3. Priprema i obrada uzoraka

Liofilizirani uzorci su homogenizirani te je po 30 mg tkiva odvagano u Eppendorf tubicu. Uzorci su otopljeni u acetonitrilu, dodatno degradirani korištenjem ultrasonične probe i centrifugirani. Supernatanti su odvojeni od taloga i osušeni na uparivaču. Osušeni supernatanti otopljeni su u 1,5 mL vode te miješani na srednjoj brzini 20 min. Nakon toga su pročišćeni na Oasis HLB Prime kolonama te je uzorak ispušten u čistu tubicu. Pročišćeni supernatanti su osušeni i pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje obrade. Detaljan opis protokola za pripremu i pročišćavanje uzoraka nalazi se u poglavlju o razvoju metode (potpoglavlja 3.1.3 i 3.1.4).

Za analizu ukupne koncentracije proteina korišteni su talozi dobiveni ekstrakcijom u acetonitrilu. Talozi su prvotno otopljeni u 200 μ L pripremljenog pufera koji sadrži RapiGest SF. Neposredno nakon dodavanja pufera, uzorci su miješani i centrifugirani. Supernatanti su prebačeni u čistu tubicu i razrijeđeni MiliQ vodom (uzorci tulara su razrijeđeni 100 $\times$, dok su uzorci mahovine razrijeđeni 10 $\times$). Koncentracija je određena metodom po Bradfordu te su koncentracije provjerene na 10% gel elektroforezi. Detaljan opis protokola za izolaciju proteina nalazi se u poglavlju o razvoju metode (potpoglavlje 3.1.8.)

Mikroplastika je izolirana iz tkiva mahovine i tulara otapanjem tkiva u smjesi HNO_3 i H_2O_2 te filtriranjem otopine kroz membranske filtere veličine pora 5 μm . Detaljan opis protokola za ekstrakciju opisan je u potpoglavlju 3.1.7. Razgradnja organske tvari u sedimentu i kućicama tulara provedena korištenjem 30% H_2O_2 , dok je samo odvajanje mikroplastike od čestica pijeska provedeno otapanjem u zasićenoj otopini NaBr ($\rho = 1,7 \text{ g cm}^{-3}$), što je omogućilo isplivavanje plastike na površinu, a zaostajanje čestica pijeska na dnu. Odvojena otopina NaBr s mikroplastikom profiltrirana je kroz membranske filtere.

3.2.4. Analiza metabolita

Prije analize osušeni supernatanti otopljeni su u 0,3 mL 50% metanola, prebačeni u staklene bočice i pripremljeni za analizu spregnutim sustavom UPLC sustavom (Ultimate 3000 RSLCnano system, Dionex, Amsterdam, Netherlands) - spektrometar masa visoke rezolucije - LTQ-Orbitrap VelosTM (Thermo Fisher Scientific, USA). Uzorci su analizirani u pozitivnom i negativnom načinu rada tzv. analizom bez cilja (eng. *non-target*), kojom se snimaju svi signali prisutni u nekom uzorku (McCord i sur. 2022). Razdvajanje analita postignuto je gradijentnim eluiranjem. U pozitivnom načinu rada za gradijentno eluiranje korišten je: metanol (pokretna faza A) i otopina 0,1% mravlje kiseline (pokretna faza B), dok je u negativnom načinu rada korišten acetonitril (pokretna faza A) i 5 mM amonijev acetat pH 9 (pokretna faza B). Spektri masa su izdvojeni u programu Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Dodatna obrada spektara, koja je uključivala detektiranje, filtriranje i grupiranje signala, prilagodbu vremena zadržavanja (eng. *retention time*), poravnanje i normalizaciju dobivenih spektara, provedena je u programu MZmine

(Katajamaa i sur., 2006). Dobiveni signali su zatim uz pomoć programa Wolfram Mathematica (version 10, Wolfram Research, UK) dodatno filtrirani te uprosječeni za svaki uzorak.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Kako bi se testirale razlike između koncentracija mikroplastike u tkivima tulara i mahovine u vremenskom periodu konstruiran je linearni mješoviti model (eng. *linear mixed-effects* – LME) u paketu 'lme4' u R programu (Bates i sur., 2015; R Core Team, 2021). U slučaju mahovine, kao fiksni efekt postavljeno je vrijeme (dani pokusa), dok je u slučaju tulara vremensku komponentu predstavljao životni stadij. Proveden je Tukeyjev test u paketu 'lsmeans' (Lenth, 2016) u R programu za testiranje značajnosti ($p < 0,05$).

Utjecaj tretmana na metabolom mahovine i tulara prikazan je analizom krivulje glavnih odgovora (eng. *principal response curves* – PRC) u R programu korištenjem paketa 'vegan' (Oksanen i sur., 2022). PRC je multivarijatna metoda koja objašnjava utjecaje pojedinih tretmana (u odnosu na kontrolu) i njihovu promjenu u vremenu (Moser i sur., 2007). PRC metoda koristi samo dio varijance, onaj koji je povezan s tretmanima i vremenom (koje se koristi kao kovarijabla). Kao mjera odstupanja tretmana od kontrolnog uzorka koristi se kanonički koeficijent (C_{dt}). Grafički prikaz rezultata PRC analize predstavlja promjena kanoničkih koeficijata različitih tretmana u vremenu. Za svaki metabolit izračunat je relativni težinski udio koji predstavlja njegov doprinos krivulji glavnih odgovora. Što je njegova apsolutna vrijednost veća, veća je vjerojatnost da slijedi odgovor prikazan PRC grafikonom. Nakon svake analize metaboliti su rangirani prema relativnim težinskim udjelima, ali rezultati nisu pokazani na grafičkim prikazima zbog velikog broja detektiranih metabolita. Korištenjem Monte Carlo metode s 999 permutacija u R programu (paket "permute") (Besag i Clifford, 1989) testirana je značajnost prve kanoničke osi te značajnost vremenske komponente u uzorcima mahovine (datum) i tulara (životni stadij). Prije provedbe PRC analize podaci su transformirani log+1 funkcijom. Metaboliti koji pokazuju najveći odgovor na tretmane izdvojeni su te identificirani usporedbom s postojećim bazama podataka (hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem, genome) te dodatno provjereni u bazi STITCH (Szklarczyk i sur., 2016) te pretraživanjem dostupne literature. Granica odstupanja dobivenih m/z vrijednosti (omjer mase i naboja) te vrijednosti u bazama postavljena je na 20 ppm. Identifikacija se smatrala validnom, ukoliko su identificirani metaboliti prethodnim istraživanjima zabilježeni u biljkama ili

kukcima. Kako bi jednostavno vizualizirali promjene koncentracije skupa metabolita korištene su toplinske mape (eng. *heat-map*) izrađene u R programu korištenjem paketa 'ggplot2' (Wickham, 2016). Toplinska mapa predstavlja matricu metabolita u kojoj je relativna koncentracija pojedinog metabolita u različitim tretmanima prikazana drugačijim intenzitetom crvene boje, pri čemu jači intenzitet boje označava višu koncentraciju metabolita. Razlike u koncentraciji proteina u tularima i mahovinama u različitim tretmanima, vremenu te razlike između spolova testirani su korištenjem analiza varijance ponovljenih mjerenja (eng. *repeated measures ANOVA* - rANOVA) u SPSS Statistics ver. 27.0 (Corp, 2020). Prije analize ispitana je raspodjela te homogenost podataka korištenjem Shapiro-Wilk i Leveneov testa. rANOVA post hoc analiza napravljena je primjenom metode Bonferroni. Dinamika izlijetanja jedinki tulara prikazana je korištenjem jednostavnog pomičnog prosjeka (eng. *simple moving average* – SMA). Metoda je korištena kako bi se izgladile kratkoročne fluktuacije i jasnije uočili trendovi izlijetanja. Jednostavni pomični prosjek napravljen je računanjem aritmetičke sredine tri uzastopne vrijednosti članova vremenskog niza.

3.3. Istraživanje utjecaja onečišćenja i suše na raznolikost mikrobne zajednice i strukturu metaboloma u obraštaju

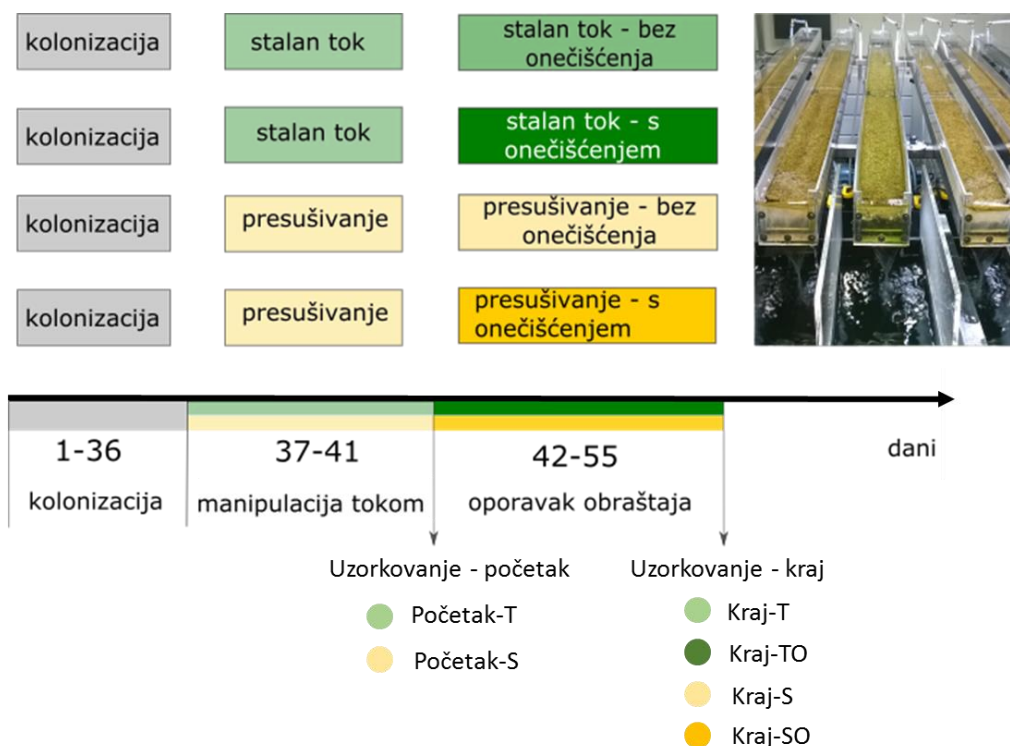
3.3.1. Prikupljanje uzoraka i provođenje pokusa

Pokus je proveden u zatvorenom sustavu umjetnih tekućica na Katalonskom institutu za istraživanje voda – ICRA (Girona, Španjolska). Sustav umjetnih tekućica sastojao se od kanala dimenzija 200 cm × 10 cm × 10 cm te spremnika vode zapremnine 70 L iz kojeg je voda kružila unutar kanala. Svaki kanal sadržavao je 5 L sedimenta koji je služio kao podloga za rast obraštaja. Protok vode unutar kanala iznosio je 50 mL s⁻¹ dok je brzina strujanja bila 0,88 ± 0,03 cm s⁻¹. Voda u kanalima se postepeno izmjenjivala te je unutar jednog dana voda u svakom kanalu bila u potpunosti zamijenjena svježom. Dubina vode u kanalima varirala je između 2,2 i 2,5 cm. Temperatura vode održavana je konstantnom (20 °C) pomoću cryo-compact cirkulatora (Julabo CF-31, Seelbach, Njemačka), a vrijednosti temperature kontrolirane su svakih 10 min. Režim svjetla reguliran je LED rasvjetom (Ligtech, Girona, Španjolska) u omjeru 9 h – dan : 15 h – noć. Fotosintetska aktivna radijacija mjerena je svakih 10 min uz pomoć kvantnih senzora postavljenih

duž kanala, a iznosila je $173,99 \pm 33 \text{ mEm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ tijekom perioda dana. Postavljeni fizikalno-kemijski parametri oponašali su prirodne uvjete zabilježene u rijeci Segre u proljetnom razdoblju za vrijeme niskog vodostaja.

Smjesa za naciepljivanje obraštaja (inokulum) prikupljena je u čistom dijelu toka rijeke Segre u Španjolskoj. Prikupljen je epilitički obraštaj (razvijen na površini kamenja) te epipsamalni obraštaj (razvijen na površini pijeska). Epilitički obraštaj prikupljen je struganjem 10-12 većih oblutaka, dok je epipsamalni obraštaj prikupljen ispiranjem oko 10 L sitnog riječnog sedimenta. Prikupljeni obraštaj naciepljivan je u kanale dva puta tjedno, dodavanjem prikupljenog inokuluma u vodu tijekom perioda kolonizacije. Nakon završetka kolonizacije, jednolikost razvijenog obraštaja provjerena je mjerenjem sljedećih parametara: vrijednost gubitka mase pri žarenju, koncentracija klorofila a, bazalna fluorescencija te stopa fotosinteze.

Postavljeni pokus trajao je ukupno 55 dana. Nakon 36 dana kolonizacije, u polovici korištenih umjetnih kanala tok je prekinut u trajanju od 5 dana što je oponašalo sušno razdoblje, dok je druga polovica kanala imala stalan tok (Slika 7). Neposredno nakon završetka manipulacije tokom malim korerom uzorkovana je obraštajna zajednica razvijena na pijesku u presušanim kanalima (Početak-S) te u kanalima s konstantnim tokom (Početak-T). Nakon uzorkovanja uspostavljen je stalan tok u svim kanalima te su u stalnim i povremenim tokovima oponašani scenariji čistog okoliša te scenariji okoliša onečišćenog farmaceuticima (Slika 7, Tablica 4). Razdoblje oporavka od suše i izlaganje onečišćivalima trajalo je 14 dana, nakon čega je ponovno provedeno uzorkovanje obraštajne zajednice iz i) konstantnog toka bez onečišćenja (Kraj-T); ii) konstantnog toka s onečišćenjem (Kraj-TO); iii) povremenog toka bez onečišćenja (Kraj-S) te iv) povremenog toka s onečišćenjem (Kraj-SO). Za svaki tretman postavljena su po tri odvojena kanala umjetnih tekućica. U tretmanima s onečišćenjem korištena je smjesa spojeva (Tablica 4) u okolišno relevantnim koncentracijama (10^{-6} g L^{-1}). Svi korišteni spojevi nalaze se na popisu za praćenje propisanom od strane Europske Unije (EU 2015/495).



Slika 7. Dizajn laboratorijskog pokusa na obraštaju u sustavu umjetnih tekućica. Prikazan je vremenski tijek kolonizacije, manipulacije tokom te oporavak mikrobne zajednice uz izlaganje onečišćivalima te vrijeme provođenja uzorkovanja. Uzorci su prikupljeni u dvije vremenske točke: Početak (Početak-T – stalan tok na početku pokusa; Početak-S – presušivanje na početku pokusa) te na kraju laboratorijskog pokusa (Kraj- T – stalan tok bez onečišćenja na kraju pokusa; Kraj-TO – stalan tok s onečišćenjem na kraju pokusa; Kraj-S – presušivanje bez onečišćenja na kraju pokusa; Kraj-SO – presušivanje s onečišćenjem na kraju pokusa).

3.3.2. Analiza metabolita i otopljene organske tvari

3.3.2.1. Kemikalije i reagensi

Za analizu metabolita u obraštaju i otopljene organske tvari u vodi korištenasu otapala HPLC razine čistoće – metanol, voda i acetonitril (Fisher Scientific, UK) te standardi iz Tablice 4 koji su bili visoke razine čistoće (> 90%) (Sigma Aldrich, SAD). Za pročišćavanje supernatanata nakon provedene ekstrakcije korišteni su membranski filter papiri promjera 47 mm s veličinom pora 5 µm (Whatmana, SAD) i Oasis HLB kolone.

Tablica 4. Standardi i unutarnji standardi korišteni u laboratorijskom pokusu na obraštaju.

spoj	upotreba spoja	unutarnji standard
eritromicin	antibiotik	eritromicin D ₄
diklofenac	anelgetik/protuupalni lijek	diclofenac ¹³ C ₆
imidakloprid	insekticid	imidakloprid D ₂
venlafaksin	antidepresiv	venlafaksin D ₄
sulfisoksazol	antibiotik	sulfisoksazol D ₄

3.3.2.2. Priprema uzoraka za analizu metabolita i otopljene organske tvari

Kako bi se umanjili utjecaji heterogenosti u svakom kanalu nasumično je prikupljeno $6 \times 0,5$ mL pijeska s razvijenim obraštajem. Uzorci su prikupljeni na početku i na kraju eksperimenta u kanalima tretiranim presušivanjem i onečišćenjem (Slika 7). Za analizu otopljene organske tvari uzorkovano je 10 mL vode iz svih tretmana i repliciranih kanala. Uzorci su pohranjeni na -80 °C do daljnje obrade. U prethodno ohlađenom 50% metanolu otopljeno je 0,5 mL pijeska s razvijenim obraštajem, te su stanice razgrađene korištenjem ultrasonične probe (Branson Digital Sonifier, model 102C; 3 ciklusa u trajanju od 120 s na 15 Hz intenziteta). Uzorci su centrifugirani na $14.000 \times g$ te su supernatanti odvojeni od taloga nakon čega su osušeni na blagoj struji dušika. Osušeni supernatanti su otopljeni u 50% metanolu, miješani 20 min na tresilici te pripremljeni za analizu spektrometrijom masa. Ekstrakcija otopljene organske tvari provedena je na 10 mL vode filtriranjem vode kroz $0,45 \mu m$ membranske filtere te pročišćavanjem na Oasis HLB kolonama. Pripremljeni uzorci analizirani su spektrometrijom masa (detaljno opisanom u potpoglavlju 3.1.5).

3.3.2.3. Obrada podataka

Prije analize podaci su transformirani trećim korijenom i centrirani. Metabolom u obraštaju te otopljena organska tvar u vodi vizualizirani su Van Krevelenovim dijagramima. Van Krevelenovi dijagrami na x-osi prikazuju omjer broja vodika i ugljika (H/C), a na osi y prikazuju omjera broja kisika i ugljika (O/C) svakog pojedinog metabolita, ovisno o njegovoj molekulskoj formuli. Prikazani metaboliti grupirani su u klase metabolita: amorfni ugljik, kondenzirani policiklički ugljikovodici, lipidi, terpenoidi, flavonoidi i poliketidi, monosaharidi, aminokiseline i peptidi kao što je predloženo u Brockman i sur. (2018). Zbog velikog broja detektiranih metabolita, Van

Krevelenovi dijagrami korišteni su samo za vizualizaciju metabolita gornjeg kvartila koji su imali najveći utjecaj na odvajanje metaboloma/otopljene organske tvari prema glavnim komponentama. Korišteni spojevi i njihovi metaboliti izuzeti su iz analize kako ne bi utjecali na rezultate. Van Krevelenovi dijagrami napravljeni su u programu Wolfram Mathematica (verzija 10, Wolfram Research, UK) (Bougard i Dray, 2018). Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis* – PCA) provedena je kako bi se ispitaio odnos između različitih tretmana na temelju vrijednosti izmjerenih varijabli računanjem sličnosti prema Bray Curtisu u Primer 7 programu (Clarke i Gorley, 2015).

3.3.3. Analiza mikrobne zajednice obraštaja

3.3.3.1. Kemikalije i reagensi

Za izolaciju DNA i RNA korišteni su komercijalno dostupni setovi (RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA te RNA - PowerSoil™ DNA - Elution Accessory kit, MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). Za uklanjanje preostale DNA iz uzoraka izolirane RNA korišten je TURBO DNAfree™ Kit (Ambion, Austin, TX, USA) te je za provjeru uklanjanja DNA na agaroznom gelu korištena univerzalna početnica 515f/806r (Caporaso i sur., 2011). Korištenjem seta Superscript III First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) napravljeno je reverzno prepisivanje RNA u komplementarnu DNA (cDNA). Prilikom sekvenciranja regije 16S rRNA korištena je početnica 515f/806r (Kozich i sur., 2013). Za pročišćavanje fragmenata umnoženog ciljanog gena korišten je komercijalno dostupni set QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). TOPO vector system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) korišten je za transformiranje pročišćenih umnoženih fragmenata gena (amplikona). Početnice korištene u qPCR reakcijama navedene su u Tablici 5. Sve qPCR reakcije provedene su korištenjem SYBRGreen boje. Za gel elektroforezu korišten je svježe pripremljeni 1 × TAE pufer. U svim koracima korištena je voda koja ne sadrži DNaze i RNaze.

Tablica 5. qPCR početnice za odabrane gene (*16S rRNA*, *Int11*, *sul1*, *sul2*, *ermB*) te uvjeti provođenja qPCR-a.

gen	početnica	sekvenca (5'–3')	veličina produkta (pb)	uvjeti	referenca
<i>16S rRNA</i>	F1048	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	146	95°C 3 min (1 ciklus); 95°C 15 s i 60 °C 1 min (35 ciklusa)	(Maeda i sur., 2003)
	R1194	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC			
<i>Int11</i>	intl1-LC1	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	196	95°C 3 min (1 ciklus); 95°C 30 s i 60°C 1 min (40 ciklusa)	(Barraud i sur., 2010)
	Intl1-LC5	GATCGGTCCGAATGCGTGT			
<i>sul1</i>	Sul(I)-FW	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	162	95°C 3 min (1 ciklusa); 95°C 15 s i 65°C 20 s (40 ciklusa)	(Pei i sur., 2006)
	Sul(I)-RV	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG			
<i>sul2</i>	Sul(II)-FW	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	190	95°C 3 min (1 ciklusa); 95°C 15 s i 58°C 20 s (40 ciklusa)	(Pei i sur., 2006)
	Sul(II)-RV	GCGTTTGATACCGGCACCCGT			
<i>erm(B)</i>	erm(B)-91f	GATACCGTTTACGAAATTGG	364	95°C 3 min (1 ciklusa); 95°C 15 s i 58°C 20 s (40 ciklusa)	(Chen i sur., 2007)
	erm(B)-454r	GAATCGAGACTTGAGTGTGC			

3.3.3.2. Izolacija nukleinskih kiselina

Iz uzoraka obraštaja prikupljenih na početku i na kraju laboratorijskog pokusa u triplicatima (tretiranih presušivanjem i onečišćenjem; Slika 7) izolirane su DNA i RNA korištenjem komercijalno dostupnih setova (RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA te RNA - PowerSoil™ DNA - Elution Accessory kit, MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). Oko 0,5 g sedimenta s razvijenim obraštajem izvagano je u tubici s navojem, dodana je otopina koja pomaže u ekstrakciji te sprječava razgradnju nukleinskih kiselina. Zatim je dodana otopina koja sadrži fenol:kloroform:izoamil alkohol. Uzorak je 15 min horizontalno miješan na tresilici te 10 min centrifugiran na 2.500 ×g. Supernatant je premješten u čistu tubicu te je dodana otopina koja omogućuje taloženje ostataka stanice i proteina. Uzorci su ostavljeni 10 min na 4 °C nakon čega su centrifugirani 10 min na 2.500 ×g. Supernatant je prebačen u čistu tubicu te je dodan 100% izopropanol te su uzorci ostavljeni 30 min na sobnoj temperaturi, centrifugirani 10 min na 2.500 ×g. Nastali talog je otopljen u zasićenoj otopini soli koja omogućuje vezanje nukleinskih kiselina za matriks kolone za ekstrakciju. Nanošenjem pufera na kolonu za ekstrakciju prema preporuci proizvođača (RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) RNA se ispire s kolone u čistu tubicu, dok DNA zaostaje na matriksu unutar kolone. Kako bi se povećala koncentracija izolirane RNA, uzorak se taloži uz

pomoć izopropanola te se otapa u 100 μ L vode. Nakon ispiranja RNA s matriksa kolone za ekstrakciju RNA, s iste kolone isprana je DNA dodavanjem pufera za ispiranje DNA (RNA - PowerSoil™ DNA - Elution Accessory kit, MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). U kolonu se dodaje pufer za ispiranje DNA koji se prikuplja u čistu tubicu. Koncentracija izolirane DNA i RNA provjerena je na Qubit® 2.0 Fluorometru (Invitrogen Molecular probes Inc., Oslo, Norveška). Prosječna koncentracija izolirane DNA bila je 45,9 ng/ μ L, dok je koncentracija RNA bila 38.6 ng/ μ L. Korištenjem komercijalno dostupnog TURBO DNAfree™ Kit (Ambion, Austin, TX, SAD) prema uputama proizvođača uklonjena je zaostala DNA iz uzoraka izolirane RNA. U čistu Eppendorf tubicu od 1,5 mL dodano je 30 mL uzorka, 3 μ L 10 $\times$ reakcijskog pufera te 1,5 μ L DNaze. Pripremljeni uzorci su 30 min grijani na 37 °C. PCR umnožavanjem 16S rRNA gena provedeno je na svim uzorcima korištenjem univerzalnih početnica 27F-1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') kako bi se provjerila učinkovitost uklanjanja DNA iz uzoraka izolirane RNA (Borneman i Triplett, 1997). Početnice su kratke jednolančane nukleinske kiseline kojima se određuje regija koja će se umnožiti DNA polimerazom (Cox, 2015). Produkti lančane reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* – PCR) nanieseni su na 1,5% agarozni gel te je provedena elektroforeza na 60 V u trajanju od 45 min, nakon čega su gelovi obojeni u 1 $\times$ TAE puferu u Gel Doc™ XR system (BIO-RAD, CA SAD). Korišten je marker za očitavanje veličine vrpce (DNA Ladder 1000 bp, GeneON, Njemačka). Korištenjem Superscript III First strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) napravljeno je reverzno prepisivanje RNA u komplementarnu DNA (cDNA). Reakcijska smjesa napravljena je miješanjem 25 μ L reakcijskog pufera, 1 μ L Oligo-početnice, 2 μ L Taq smjese, 5 μ L RNA predloška te 17 μ L vode koja ne sadrži DNaze i RNaze. Prepisivanje RNA u cDNA provedeno je PCR umnažanjem prema uvjetima navedenim u Tablici P7. Svi izolirani uzorci u svim fazama bili su pohranjeni na –80 °C.

3.3.3.3. Sekvenciranje 16S rRNA hipervarijabilne regije

Korištenjem početnice 515f/806r (Caporaso i sur., 2011) napravljeno je sekvenciranje sljedeće generacija (eng. *next generation sequencing* - NGS) ciljane V4 regije 16S rRNA na Illumina MiSeq System (2 $\times$ 250 PE na Research Technology Support Facility Michigan State University, SAD (Kozich i sur., 2013). Sekvenciranje sljedeće generacije podrazumijeva tehnologiju visoke propusnosti koja određuje sekvence nukleinskih kiselina i identificira razlike unutar uzoraka. Ono

omogućava karakterizaciju mikrobnih zajednica izvan mogućnosti klasičnih metoda (Alekseyev i sur., 2018; Maeda i sur., 2003). Bioinformatičke analize sekvenci provedene su koristeći platformu QIIME2 2020.11 (Bolyen i sur., 2019). Demultipleksiranje i filtriranje sekvenci provedeno je korištenjem *demux* komponente. U slijedećem koraku filtrirane su smetnje i napravljena je dereplikacija korištenjem DADA2 komponente (*dada2*) (Callahan i sur., 2016). Sljedovi nukleotida grupirani su u varijante amplikonskih sekvenci (eng. *amplicon sequence variant* – ASV). Taksonomsku klasifikaciju ASV napravljena je korištenjem Silva 132 baze podataka (Quast i sur., 2013). Nakon taksonomske klasifikacije iz podataka su uklonjene rijetke sekvence (< 25% uzoraka) kao i one koje imaju nizak broj pojavljivanja u cijelom setu podataka (< 100). Za procjenu različitosti mikrobne zajednice obraštaja između pojedinih uzoraka (beta raznolikost) napravljena je rarefakcija. Tijekom rarefakcije broj sekvenci u svakom uzorku normaliziran je nasumičnim odabirom podskupa od 60.000 (DNA) i 90.000 (cDNA) sekvenci po uzorku kako bi se smanjila pogreška uslijed različite dubine sekvenciranja u pojedinim uzorcima.

3.3.3.4. Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Za simulaciju utjecaja onečišćenja na zajednicu obraštaja korištena je smjesa farmaceutika koja je između ostalih spojeva sadržavala dva antibiotika: sulfisoksazol (klasa sulfonamida) i eritromicin (klasa makrolida). Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR* ili *quantitative PCR* – qPCR) korištena je za kvantificiranje broja kopija četiri gena koji kodiraju za otpornost na antibiotike korištene u ovom istraživanju. U DNA i cDNA uzorcima izoliranih iz bakterijske komponente obraštaja kvantificirani su geni tj. njihova ekspresija: i) *sul1* koji kodira enzim dihidropteroat sintazu gram-negativnih bakterija otpornih na sulfonamide te je povezan s drugim genima otpornosti integrona klase 1, ii) *sul2* koji kodira enzim dihidropteroat sintazu gram-negativnih bakterija otpornih na sulfonamide (gen se uobičajeno nalazi u plazmidima) te iii) *ermB* koji kodira enzim ribosomsku metilazu B uobičajeno kod gram-pozitivnih bakterija otpornih na makrolide. Također je kvantificiran gen integron-integrase klase 1 (*intI1*) koji kodira enzim integrazu 1 gram-negativnih bakterija. Gen *intI1* služi kao pokazatelj antropogenog onečišćenja i horizontalnog prijenosa gena (Gillings i sur., 2015; Stalder i sur., 2014), a povezan je i s otpornošću na izloženost antibioticima, dezinfekcijskim sredstvima i teškim metalima (Zheng i sur., 2020a). Svi geni su kvantificirani pomoću početnica i uvjeta navedenih u Tablici 5. qPCR standardne krivulje dobivene su serijom razrjeđenja ekstrakata DNA i cDNA koji sadrže poznatu

koncentraciju ciljnog gena u rasponu od 10^1 do 10^2 kopije gena μL^{-1} . Svi geni kvantificirani su korištenjem SYBRGreen boje na sustavu MX3005 (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, SAD) (Subirats i sur., 2018). Svaka reakcija je provedena na mikropločama ukupnog volumena $30\ \mu\text{L}$, te je sadržavala $1\ \mu\text{L}$ DNA ili cDNA predloška, odgovarajuću koncentraciju $0,2\ \mu\text{M}$ svake početnice te $2 \times$ Brilliant III Ultra Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD). Svi uzorci su kvantificirani u duplikatima koristeći standardne krivulje s visokim korelacijskim koeficijentom (u prosjeku $> 0,998$), pokazujući visoku iskoristivost ($91,86 \pm 3,18\%$) i široko dinamičko područje. Koncentracije ciljanih gena normalizirane su korištenjem broja kopija gena *16S rRNA*.

3.3.3.5. Analiza podataka i statistički postupci

Za karakterizaciju raznolikosti mikrobne zajednice obraštaja (alfa raznolikost) određeno je bogatstvo vrsta (koristeći Chao 1 indeks) te bogatstvo i ujednačenost vrsta prisutnih u uzorku (koristeći Shannonov indeks). Alfa raznolikost određena je korištenjem diversity komponente platforme QIIME2. Studentov *t*-test korišten je za procjenu značajnosti razlike indeksa između pojedinih uzoraka/tretmana. Za procjenu različitosti mikrobne zajednice između uzoraka (beta raznolikost) izračunata je Bray-Curtisova matrica sličnosti koja se temeljila na prosječnim ASV vrijednostima transformiranim Hellingerovom transformacijom. Dobivene matrice udaljenosti vizualizirane su koristeći analizu glavnih koordinata (eng. *principale coordinate analysis* – PCoA), statističku metodu kojom se visoko dimenzionalni podaci iz matrica sličnosti/udaljenosti reduciraju u niže dimenzionalni prostor uz očuvanje varijance koja je prisutna u originalnim podacima. Struktura zajednice je analizirana u R programu korištenjem '*phyloseq*' paketa (McMurdie i Holmes, 2013).

Značajnost promjene koncentracije gena dobivene metodom qPCR određivana je ANOVA testom za normalno distribuirane podatke i neparametrijskim Kruskal-Wallis testom za asimetrično distribuirane. Testovi su provedeni u R programu korištenjem paketa '*vegan*' (Oksanen i sur., 2022).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka

4.1.1. Utjecaj SPE kolona na učinkovitost izolacije

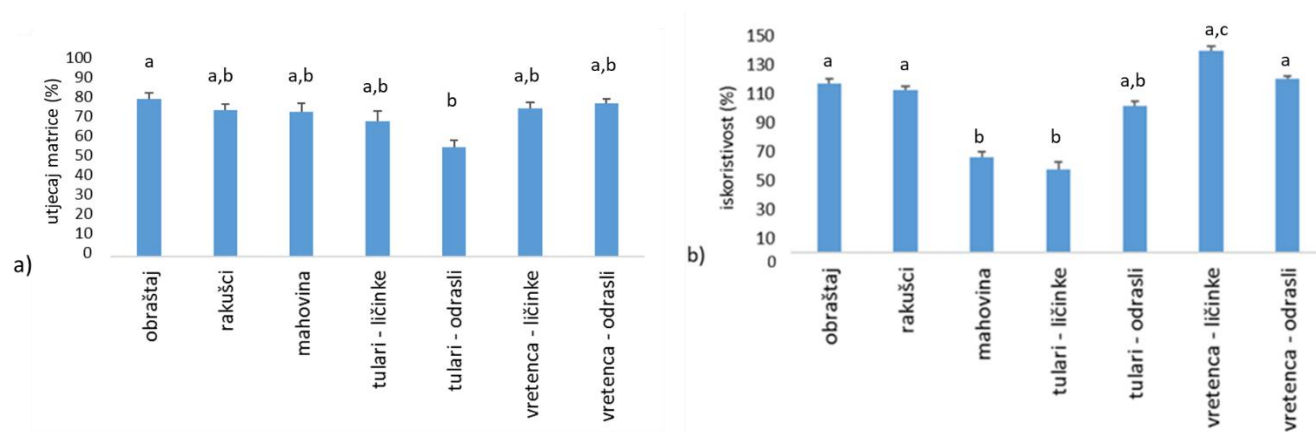
Objekti kolone za pročišćavanje supernatanta (Oasis HLB i Oasis HLB Prime) pokazale su se učinkovitima (Álvarez-Sánchez i sur., 2010). Razlika u vrijednostima utjecaja matrice između korištenih kolona nije bila statistički značajna ($F(2, 60) = 0,15$; $p = 0,7$). Oasis HLB Prime kolone postizale su u prosjeku 25% nižu iskoristivost metode u odnosu na Oasis HLB kolone ($F(2, 60) = 5,53$; $p = 0,001$), iako je sama provedba jednostavnija i znatno brža (Tablica P1). Bolja iskoristivost Oasis HLB kolona vjerojatno je posljedica provođenja dodatnih koraka (kondicioniranje i uravnoteženje) prije nanošenja samog uzorka. Stoga izbor između ove dvije SPE kolone ovisi o postavkama samog istraživanja. Na primjer, ako istraživanje uključuje velik broj uzoraka s ciljem detektiranja općih obrazaca, Oasis HLB Prime bi bio bolji izbor zbog brže izvedbe, dok Oasis HLB daje preciznije i pouzdanije rezultate u slučajevima kada je potrebno precizno određivanje koncentracije pojedinog spoja.

4.1.2. Utjecaj matrice

Zabilježena je statistički značajna razlika ($F(6, 21) = 3,133$; $p = 0,006$) između utjecaja matrice u različitim tkivima. Kod većine testiranih spojeva uočena je supresija signala zbog utjecaja matrice, koja je u prosjeku iznosila 72%. Sličan rezultat o utjecaju matrice zabilježen je prethodnim istraživanjem provedenim na školjkašima (Alvarez-Muñoz i sur., 2015). Najveća supresija signala zabilježena je u obraštaju i mahovini (80%), a najniža u odraslim tularima (63%) (Tablica P2). Istraživanja su pokazala da određeni organi (npr. jetra) ili životinjske vrste koje sadrže veći postotak lipida postižu lošije rezultate zbog visokog utjecaja matrice (Alvarez-Muñoz i sur., 2015; Grabicova i sur., 2018; Ziarrusta i sur., 2016). Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je smanjenje utjecaja matrice od ličinačkog prema odraslom stadiju tulara, iako razlika nije bila statistički

značajna, dok kod vretenaca nije uočen sličan trend (Slika 8a). Takvi rezultati vjerojatno su posljedica razlike u tipu preobrazbe, s obzirom da tulari imaju potpunu preobrazbu te prilikom stadija kukuljice gube značajnu količinu masnih zaliha (Past, 1971), dok u vretenaca, stadij kukuljice izostaje te je utjecaj matrice sličan u ličinačkom i odraslom stadiju (Slika 8a).

Utjecaj matrice do danas nije mjereno u uzorcima obraštaja i mahovine, ali su naši rezultati usporedivi s rezultatima zabilježenim na riječnom sedimentu i biljkama (Barreales-Suárez i sur., 2018; Cueva-Mestanza i sur., 2008; Petrie i sur., 2014; Riemenschneider i sur., 2017).



Slika 8. a) Prosječni utjecaj matrice (%) i b) iskoristivost metode (%) prikazana kao srednja vrijednost (+standardna greška) izmjerena u okolišnim uzorcima: obraštaj, rakušci, mahovina te odrasli i ličinački stadiji vretenaca i tulara. Različita slova označavaju značajne razlike između setova podataka.

Tablica 6. Prosječne vrijednosti utjecaja matrice (%) i iskoristivosti metode (%) za korištene spojeve (farmaceutike) izmjeren u okolišnim uzorcima (ličinke i odrasle jedinke tulara, rakušci, obraštaj, ličinke i odrasle jedinke vretenaca, mahovina). SE – standardna pogreška, min – najmanja vrijednost, max – najveća vrijednost.

spoj	utjecaj matrice				iskoristivost metode			
	srednja vrijednost	SE	min	max	srednja vrijednost	SE	min	max
paracetamol	46,97	5,56	33,87	67,07	122,26	9,15	85,72	153,29
benzilparaben	68,12	7,71	38,37	81,02	140,69	31,01	32,18	283,70
deksametazon	67,16	6,98	42,91	86,06	122,04	15,91	62,35	181,56
diklofenac	61,21	6,45	39,39	76,87	108,70	14,90	57,83	174,19
etilparaben	44,24	11,89	2,10	73,63	112,30	17,66	47,96	172,33
gemfibrozil	68,37	5,65	46,94	80,42	131,09	22,14	40,11	203,32
hidroklorotiazid	74,75	3,26	62,93	82,79	120,26	14,69	53,90	164,22
ketoprofen	54,32	2,68	46,52	61,78	140,47	12,55	100,51	189,26
naproxen	59,07	3,42	46,58	67,25	120,85	10,30	82,93	167,12
1H benzotriazol	72,33	5,87	53,84	85,86	98,59	12,80	82,93	167,12
azaperol	87,74	2,23	80,81	92,31	89,45	7,33	52,21	132,20
azaperone	87,21	2,76	78,23	92,82	83,32	15,48	58,86	111,21
kofein	44,53	8,61	27,58	65,76	103,94	5,84	76,68	124,16
karbamazepin	80,18	3,56	67,54	87,97	92,42	15,28	32,84	139,86
klopidogrel	84,16	2,18	78,26	89,78	86,53	18,23	19,99	136,56
difenilhidramin	76,27	4,58	59,09	86,46	81,62	9,13	37,99	106,82
epoksi karbamazepin	65,60	5,75	26,98	87,32	100,16	8,19	47,58	137,33
met benzotriazol	74,84	6,05	54,11	87,27	89,08	10,93	41,36	117,83
propanolol	77,39	2,80	69,84	86,96	89,03	9,47	48,40	119,11
ranitidin	68,77	15,11	8,44	86,15	90,71	7,98	62,04	122,88
sertralin	80,09	2,75	69,78	85,47	74,48	9,33	33,93	98,58
sotalol	75,24	10,15	34,92	87,11	87,54	5,79	64,87	105,58
trisbutoksi fosfat	90,48	2,08	82,58	94,74	96,13	19,13	30,79	166,74
triskloroizopropil fosfat	83,80	3,03	72,76	90,22	82,01	12,80	29,01	121,98
tiebendazol	83,85	3,42	71,68	91,86	93,91	11,65	42,12	127,59

4.1.3. Iskoristivost metode

Prosječna iskoristivost metode između matrica iznosila je između 57% i 139% (Slika 8b), dok je standardna pogreška bila ispod 8% za većinu spojeva unutar matrica (Tablica P1), što ukazuje na visoku razinu ponovljivosti (Alvarez-Muñoz i sur., 2015). Većina proučavanih spojeva postigla je iskoristivost iznad 40% unutar većine matrica, što se smatra prihvatljivim rezultatom s obzirom na različita fizikalno-kemijska svojstva spojeva (lipofilnost i pK_a) te na gubitak spojeva prilikom pročišćavanja bioloških uzoraka (Alvarez-Muñoz i sur., 2015; Fernandez-Torres i sur., 2011) (Tablica 6). Zabilježena je statistički značajna razlika u iskoristivosti metode između korištenih tkiva ($F(6,175) = 30,536$; $p < 0,001$). Prosječna iskoristivost metode za većinu spojeva unutar složenih bioloških matrica bila je u skladu s rezultatima drugih istraživanja provedenih na makroskopskim beskralježnjacima, ribama, biljkama i mulju (Azzouz i sur., 2011; Cueva-Mestanza i sur., 2008, 2008; Gros i sur., 2012; Riemenschneider i sur., 2017; Wu i sur., 2012).

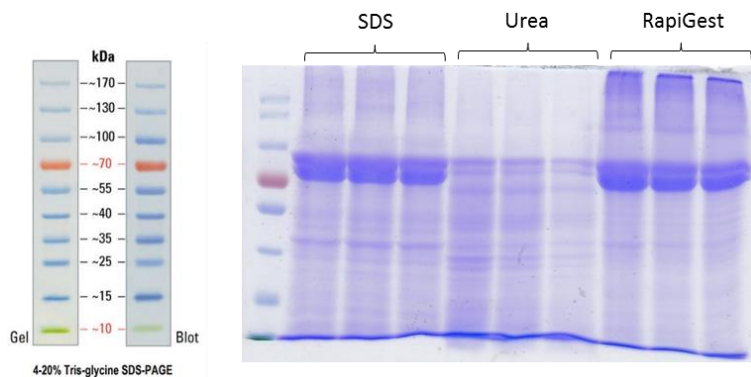
4.1.4. Izolacija mikroplastike iz okolišnih uzoraka

Granule plastike (Tablica 2) izgubile su prosječno manje od 0,04% početne težine prilikom provedbe protokola za razgradnju tkiva (potpoglavlje 3.1.7.). Protokol iii) u kojem je korištena smjesa HNO_3 i H_2O_2 pokazao je najbolje rezultate razgradnje tkiva te je njegova provedba najbrža i najjednostavnija. Pomoću protokola iii) testiran je prosječni gubitak čestica za četiri tipa mikroplastike (Tablica 2). Prosječna pogreška u brojanju čestica prije implementacije protokola iznosila je 3%, dok je nakon implementacije protokola iii) prosječni gubitak iznosio 18,5% ($F(6,18) = 0,75$; $p < 0,001$). U prosjeku je najveći gubitak čestica uočen za polistiren (45,7%). Polistiren je od odabranih tipova plastike najosjetljiviji na izlaganje niskim pH vrijednostima, zbog čega dolazi do deformiranja strukture čestica te sljepljivanja čestica (Dehaut i sur., 2016). Prisutnost masti u životinjskim uzorcima (ličinački stadiji tulara i vretenaca) također je uzrokovala sljepljivanje mikroplastike, što je otežavalo detekciju i brojanje. Otežana izolacija mikroplastike iz tkiva bogatih mastima je uočena i prethodnim istraživanjem (Dawson i sur., 2020). S druge strane, okolišni uzorci poput obraštaja sadržavaju čestice mineralnog supstrata (sediment), kojeg je lako zamijeniti za čestice mikroplastike (Monteiro i Pinto da Costa, 2022). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u gubitku čestica između različitih tipova mikroplastike i različitih tkiva

($F(6,18) = 0,87$; $p = 0,43$; $F(3,18) = 0,02$; $p = 1$). Prema tome, gubitak nije ovisio o tipu tkiva kao ni o tipu mikroplastike.

4.1.5. Učinkovitost izolacije proteina upotrebom različitih surfaktanata

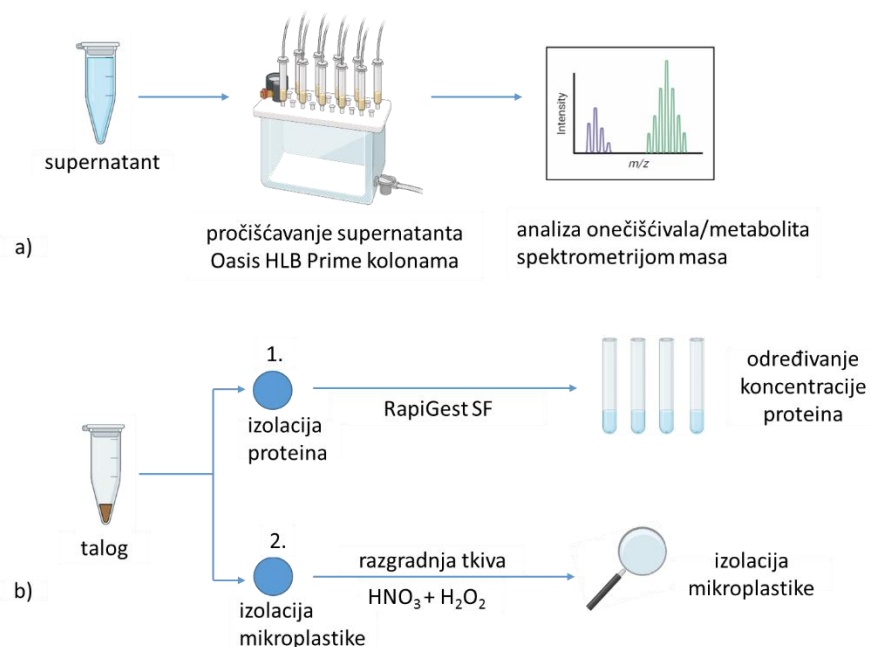
Testirani surfaktanti korišteni u izolaciji proteina iz uzoraka tulara pokazali su zadovoljavajuće rezultate, osobito RapiGest SF i urea, koji su prigodni i za analizu proteoma korištenjem spektrometrije masa (Pop i sur., 2014) (Tablica P3). Zabilježena je statistički značajna razlika u učinkovitosti izolacije proteina između sva tri korištena surfaktanta ($F(3, 33) = 16,32$; $p < 0,001$). Najmanja učinkovitost izolacije proteina zabilježena je u najčešće upotrebljavanog surfaktanta – SDS ($0,97 \text{ mg L}^{-1}$), dok je najveća koncentracija izoliranih proteina zabilježena upotrebom RapiGest SF ($22,81 \text{ mg L}^{-1}$). Postignuti rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim prethodnim istraživanjima prilikom izoliranja membranskih proteina te kompletnog proteoma (Wu i sur., 2011). Rezultati elektroforeze na gelu pokazali su da RapiGest SF i SDS izoliraju sličan profil proteina, s većom učinkovitošću u izolaciji većih proteina, dok je urea pokazala veću učinkovitost u izolaciji manjih proteina (Slika 9). Dodatno, korištenjem BSA kao kontrole pokazano je da protokol izolacije sa SDS-om nije kompatibilan s kvantifikacijom proteina metodom po Bradfordu, prema tome nije prikladan za planirani eksperimentalni tijek. Prema dobivenim rezultatima, protokol sa surfaktantom RapiGest SF se pokazao najefikasnijim u izolaciji proteina te je korišten u daljnjem istraživanju.



Slika 9. Koncentracija proteina (kDa) provjerena elektroforezom na gelu nakon izolacije iz ličinki tulara korištenjem tri surfaktanta: SDS (natrijev dodecil-sulfat), urea i RapiGest SF, provjerena elektroforezom na gelu.

4.1.6. Kratki opis razvijene metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka

Razvijena metoda pokazala se vrlo učinkovitom u izolaciji kemijskog onečišćenja iz različitih tipova okolišnih uzoraka te omogućuje praćenje odgovora organizama na stres na razini proteina i metaboloma. Otapanjem uzoraka tkiva u acetonitrilu, dodatnom razgradnjom stanica ultrasoničnom sondom te odvajanjem taloga od supernatanta omogućena je izolacija kemijskih onečišćivala i metabolita iz supernatanta te proteina i mikroplastike iz taloga (Slika 1, Slika 10a i 10b). S obzirom da su obje SPE kolone pokazale zadovoljavajuće rezultate iskoristivosti metode i utjecaja matrice, u daljnjim istraživanjima korištena je Oasis HLB Prime kolona zbog oko 40% brže implementacije protokola od Oasis HLB kolone (Slika 10a). Protokoli za razgradnju tkiva pokazali su se podjednako učinkovitim, međutim zbog brže i jednostavnije provedbe korišten je protokol sa smjesom HNO_3 i H_2O_2 (Slika 10b). Za izolaciju proteina najučinkovitiji se pokazao protokol s RapiGest SF surfaktantom, koji je pogodan i za analizu proteina na spektrometriji masa, zbog čega je izolacija proteina u daljnjim istraživanjima provedena prema ovom protokolu (Slika 10b).



Slika 10. Pojednostavljeni prikaz razvijene metode za a) pročišćavanje supernatanta korištenjem SPE kolona te b) izolacije mikroplastike i proteina iz taloga.

Za razliku od dostupnih protokola za detekciju onečišćivala, ova metoda nije usko specijalizirana za izolaciju određenih skupina kemijskih onečišćivala (Afonso-Olivares i sur., 2016; Alvarez-Muñoz i sur., 2015; Azzouz i sur., 2011; Huerta i sur., 2015; Omar i sur., 2016; Paíga i sur., 2017; Santos i Ramos, 2016), nego daje zadovoljavajuće rezultate u izolaciji širokog spektra kemijskih onečišćivala. Također, metoda omogućuje detekciju mikroplastike kao jednog od široko rasprostranjenih oblika onečišćenja (Koutnik i sur., 2021). Budući da posljedice dugoročne izloženosti onečišćenju najčešće nisu odmah vidljive na makroskopskoj razini, uz detekciju i kvantifikaciju onečišćivala u okolišu, praćenje molekularnih odgovora (npr. na razini proteina i metabolita) organizama koji su njima izloženi omogućuje bolje razumijevanje procesa koji se odvijaju uslijed izlaganja (višestrukom) stresu (Allwood i sur., 2021). Glavna prednost ove metode je što omogućuje provedbu niza analiza iz jednog uzorka tkiva, pri čemu se ubrzava sam proces obrade te se smanjuje ukupni trošak provođenja pokusa.

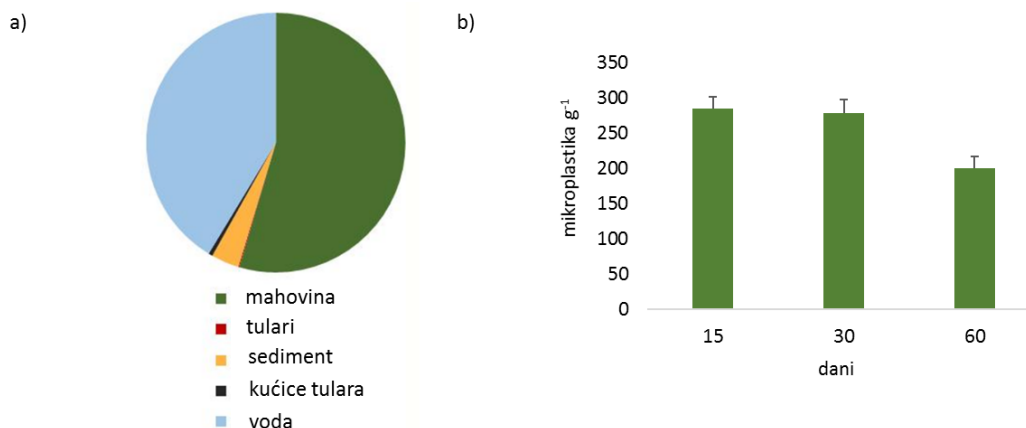
4.2. Istraživanje utjecaja mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora na strukturu metaboloma i proteoma mahovine i tulara

4.2.1. Zastupljenost čestica mikroplastike u mahovini i sedimentu

Rasprostranjenost čestica mikroplastike unutar mezokozmos sustava određena je analizom uzoraka sedimenta, mahovine, tkiva i kućica tulara vrste *M. nycterobia*. Najveći udio čestica zabilježen je na površini mahovine, a iznosio je $254,5 \pm 14,08$ čestica g^{-1} suhog tkiva (Tablica P4, Slika 11a). Koncentracija mikroplastike na mahovini pokazivala je statistički značajne varijacije kroz vrijeme trajanja pokusa ($F(3,20) = 61,71$; $p < 0,001$). Najveća koncentracija zabilježena je 15. dana ($284,65 \pm 17,42$ čestica g^{-1}) i 30. dana pokusa ($278,31 \pm 19,79$ čestica g^{-1}) te se značajno smanjila prema kraju pokusa ($200,56 \pm 16,08$ čestica g^{-1}) (Slika 11b; Tablica P4). Velika adsorpcija čestica mikroplastike na površinu mahovine vjerojatno je posljedica guste i razgranate strukture biljke (Bhattacharya i sur., 2010), ali i njezinog položaja unutar akvarija, odnosno vertikalnog pružanja duž vodenog stupca. Za razliku od mahovine, u sedimentu je na kraju pokusa zabilježena iznimno niska koncentracija mikroplastike ($1,19 \pm 0,27$ čestica g^{-1}), koja čini oko 4% ukupne količine mikroplastike dodane u sustav na početku pokusa (Slika 11a).

Niska koncentracija mikroplastike u sedimentu upućuje na spor razvoj obraštaja koji pospješuje njenu sedimentaciju (Fazey i Ryan, 2016; Kaiser i sur., 2017; Miao i sur., 2021). Istraživanja pokazuju da je česticama plastike manje gustoće (npr. polietilen, $\rho = 0,86 \text{ g cm}^{-3}$), čak i nakon uočenog stvaranja obraštaja, potrebno preko sedam tjedana kako bi se sedimentirale na dno (Kowalski i sur., 2016; Leiser i sur., 2020). Poznato je da i kopnene i vodene biljke mogu adsorbirati plastiku na svoju površinu, ali samo je nekoliko istraživanja pratilo akumulaciju nano- i mikroplastike na mahovinama (Capozzi i sur., 2018; Roblin i Aherne, 2020). Capozzi i sur. (2018) uočili su da se unutar zatvorenog slatkovodnog ekosustava preko 50% čestica adsorbira na površinu mahovine, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (Slika 11a). Prema tome, osim što ima potencijal kao pokazatelj onečišćenja mikroplastikom u slatkovodnim i kopnenim ekosustavima (Capozzi i sur., 2018; Roblin i Aherne, 2020), mahovina pokazuje i veliki potencijal za uklanjanje čestica iz vodenog stupca. To je osobito važno za plastiku niže gustoće,

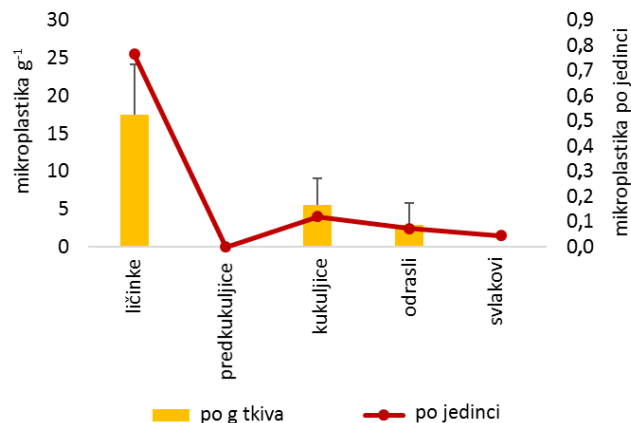
kao što su polietilen i polipropilen, koji i jesu među najčešćim tipovima plastike koje pronalazimo u okolišu (Scherer i sur., 2020).



Slika 11. Prisutnost mikroplastike kao a) relativni udio u komponentama mezokozmos pokusa; b) koncentracija čestica mikroplastike (g^{-1} + standardna pogreška) na mahovini tijekom trajanja pokusa.

4.2.2. Zastupljenost čestica mikroplastike u različitim razvojnim stadijima tulara

U jedinkama tulara pronađen je vrlo mali broj čestica mikroplastike. Međutim, broj pronađenih čestica statistički se značajno mijenjao kroz životne stadije tulara ($F(3,18) = 5,66$; $p = 0,007$). Najveća koncentracija mikroplastike zabilježena je u ličinkama ($F(3,18) = 4,34$; $p = 0,018$), kao jedinom stadiju koji se hrani (Thorp i Rogers, 2011), što ukazuje na mogući unos čestica putem hrane (Redondo-Hasselerharm i sur., 2018; Scherer i sur., 2020; Windsor i sur., 2019). Isti obrazac uočen je i izražavanjem koncentracije mikroplastike po gramu suhog tkiva tulara (Slika 12). Nasuprot tome, u životnim stadijima koji se ne hrane (predkukuljice, kukuljice i odrasli) pronađen je mali udio čestica dodanih u sustav na početku pokusa (0,13%) (Slika 12). Međutim, u jedinkama koje su prije uzorkovanja ostavljene u čistoj vodi na 24 h kako bi izbacile sadržaj crijeva, nije zabilježena ni jedna čestica mikroplastike. Ovaj rezultat pokazuje da većina čestica samo prolazi kroz probavni sustav tulara, bez ugradnje u njihova tkiva.



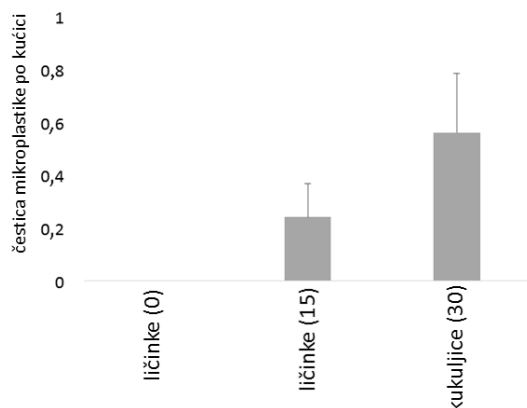
Slika 12. Koncentracija čestica mikroplastike (g^{-1} + standardna pogreška) zabilježena u tkivu tulara kroz različite životne stadije (izraženo u masi suhog tkiva te po jedinci tulara).

Budući da tulari neposredno prije izlijetanja izlaze iz vode te ostavljaju svlak na okolnoj vegetaciji, čestice mikroplastike koje su zaostale na površini tijela vjerojatno će biti odbačene zajedno sa svlakom, zbog čega pronalazak čestica u odraslim jedinkama (Slika 12) ukazuje na moguću ugradnju mikroplastike u tkivo tulara. Prijenos mikroplastike i drugih onečišćivala iz vodenog u kopneni ekosustav putem vodenih kukaca može uzrokovati njihovo akumuliranje u kopnenim predatorima (pauci, odrasla vretenca, ptice, šišmiši i dr.) (Cetinić i sur., 2021; Previšić i sur., 2020; Thorp i Rogers, 2011).

4.2.3. Mikroplastika u kućicama tulara

Osim što unose mikroplastiku u organizam, tulari je koriste i kao materijal za izgradnju kućica. Naime, čestice mikroplastike pronađene su u kućicama ličinki i kukuljica (Slika 13). Veći broj čestica pronađen je u kućicama kukuljica ($0,58 \pm 0,23$ čestica po kućici) nego u kućicama ličinki ($0,25 \pm 1,3$ čestica po kućici). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom da neposredno prije stvaranja kukuljice, tulari okolnim sedimentom nadograđuju kućicu koju su imali u posljednjem stadiju ličinke. Zabilježena razlika nije bila statistički značajna ($F(1,11) = 1,69$; $p = 0,22$), moguće zbog malog broja uzoraka uključenih u analizu. Prethodna istraživanja (Ehlers i sur., 2020, 2019; Gallitelli i sur., 2021; Tibbetts i sur., 2018) zabilježila su statistički značajne razlike između kućica različitih razvojnih stadija, ali je koncentracija mikroplastike u sustavu bila 2–40× viša nego u

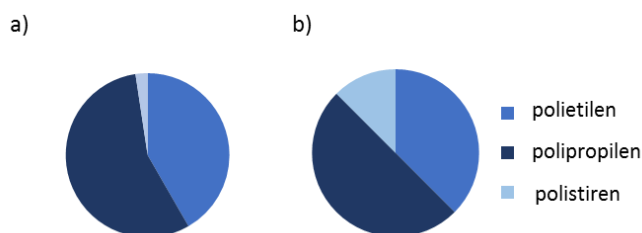
našem istraživanju. Iako mikroplastika ugrađena u kućice tulara nema izravan utjecaj na organizme, zbog niže gustoće plastike u odnosu na čestice sedimenta koje tulari inače koriste u izgradnji kućica, stabilnost kućice može biti narušena, što može dovesti do otežanog kretanja te povećane izloženosti tulara predatorima (Ehlers i sur., 2020, 2019).



Slika 13. Broj čestica mikroplastike pronađenih u kućicama tulara + standardna pogreška.

4.2.4. Unos čestica mikroplastike u tularu konzumiranjem mahovine

Najzastupljeniji tip polimera zabilježen na mahovini bio je polipropilen, zatim je slijedio polietilen, dok je polistiren bio zastupljen u vrlo niskim koncentracijama u analiziranim uzorcima. Sličan obrazac uočen je i u uzorcima tulara (Slika 14a i 14b), što ukazuje na to da su tulari najvjerojatnije primarno unosili mikroplastiku konzumiranjem mahovine. Iako ni jedno dosadašnje istraživanje nije povezalo prisutnost mikroplastike na mahovini s prijenosom u vodene beskrležnjake, Mateos-Cárdenas i sur. (2022) utvrdili su unos čestica polietilena u rakušca (*Gammarus duebeni* Lilljeborg, 1852) konzumacijom vodene leće (*L. minor*). Također, brojna istraživanja provedena u prirodnim vodenim tijelima ukazuju na mogući unos mikroplastike u vodene beskrležnjake hranjenjem (Foley i sur., 2018; Nelms i sur., 2018; Redondo-Hasselerharm i sur., 2018; Wagner i sur., 2014; Windsor i sur., 2019). Ovo istraživanje potvrđuje da se putem mahovine, koja ima veliku sposobnost zadržavanja mikroplastike na svojoj površini, čestice mogu prenositi kroz hranidbeni lanac.



Slika 14. Omjer tipova mikroplastike u prosječnom broju čestica zabilježenih u a) mahovini i b) tularima.

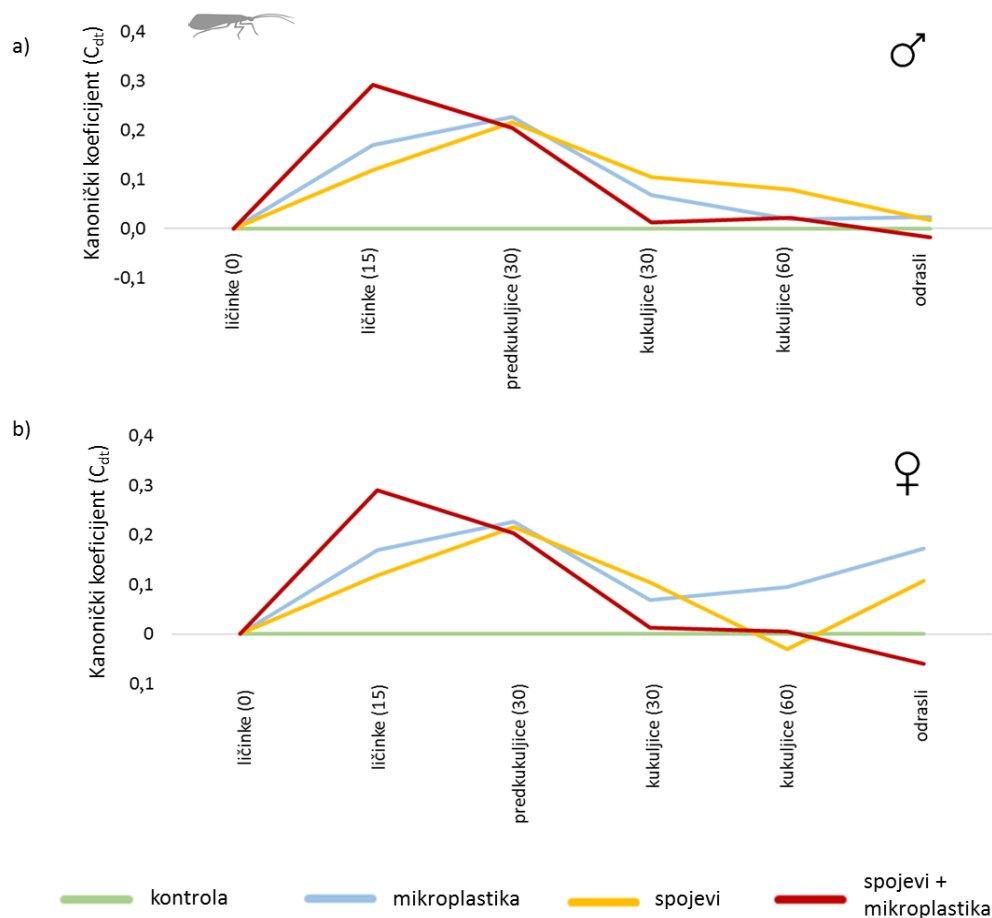
4.2.5. Utjecaj mikroplastike, smjese farmaceutika i endokrinih modulatora na tulare

Utjecaji mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora te njihove kombinacije analizirani su na molekularnoj razini: produkcija proteina i promjena metaboličkih profila. PRC analize sastava metabolita potvrđuje da je 33% ukupne varijance podataka objašnjeno promjenom životnog ciklusa tulara, dok je 60% objašnjeno utjecajem tretmana. Monte Carlo permutacija pokazala je značajnu ordinaciju ($F(3,18) = 152,55$; $p = 0,001$; svojstvena vrijednost = 3063,70). Rezultati PRC analize pokazuju odvajanje uzoraka izloženih stresorima od kontrole ovisno o promjeni sastava i strukture metabolita kroz vrijeme trajanja pokusa (Slika 15a i 15b). U odnosu na kontrolu, najveća odstupanja uočena su u stadiju ličinke i predkukuljice, dok su razlike bile manje izražene u stadiju kukuljice. Veća odstupanja u stadiju ličinke zabilježena su u tretmanima koji su uključivali mikroplastiku. Ovi rezultati se slažu s rezultatima dobivenim analizom koncentracije mikroplastike u tkivima tulara (Slika 12) te je vjerojatno upravo povećana koncentracija mikroplastike u probavnom sustavu ličinki uzrokovala najveće odstupanje od kontrole. Povećani odgovor na stres u vodenim beskralježnjacima može biti posljedica oštećivanja epitela crijeva uslijed unošenja čestica mikroplastike u probavni sustav, kao što je uočeno u ličinkama dvokrilaca vrste *Chironomus riparius* Meigen, 1803 (Silva i sur., 2021). Iako se predkukuljice tulara ne hrane, kod njih je, također, zabilježeno visoko odstupanje od kontrole. U dostupnoj literaturi nema istraživanja koja razjašnjavaju zabilježeni obrazac, međutim, postoji vjerojatnost da mehanizmi u tom stadiju i dalje ostaju aktivni. Smanjeno odstupanje od kontrole u kukuljicama izloženim stresorima može upućivati na stabilizaciju fizioloških procesa kukaca ili

možda smanjenu reakciju na okoliš uslijed intenzivne metaboličke promjene za vrijeme procesa metamorfoze. S obzirom na nedostatak saznanja, ove pretpostavke potrebno je dodatno istražiti.

Uočeno je da izloženost farmaceuticima i endokrinim modulatorima pokazuje slične varijacije u metaboličkim setovima podataka kao i mikroplastika (Slika 15) ukazujući na to da je stres izazvan mikroplastikom usporediv sa stresom izazvanim smjesom farmaceutika i endokrinih modulatora. Prethodnim istraživanjima uočeno je da farmaceutici i endokrini modulatori uzrokuju povišenu razinu stresa kod vodenih beskralježnjaka (Gómez-Canela i sur., 2016; Previšić i sur., 2020), međutim, ovo istraživanje nadograđuje rezultate praćenjem dinamike fizioloških odgovora tulara. Iako su individualni utjecaji stresora (mikroplastike i spojeva) uzrokovali sličnu razinu stresa u tularima, postoje naznake sinergijskog (kombiniranog) učinka pri izlaganju kombinaciji onečišćivala. Aditivni učinak je uočen samo u ličinačkom stadiju na početku pokusa, te nestaje u kasnijim stadijima (Slika 15). Takav rezultat upućuje na povećanu razinu stresa uslijed izlaganja višestrukome stresu, ali i na brzu prilagodbu organizama na promjenu uvjeta u okolišu (Overgaard i Sørensen, 2008; Pallarés i sur., 2017).

Istraživanja koja prate utjecaje mikroplastike u kombinaciji s drugim okolišnim stresorima u blagom su porastu (Green i sur., 2019), dok istraživanja kombiniranog utjecaja mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora na slatkovodne kukce u potpunosti izostaju. Međutim, istraživanja na mekušcima ukazuju da mikroplastika može služiti kao vektor prijenosa toksičnih spojeva te da se fiziološki odgovor jedinki vrste *Unio tumidus* Philipsson, 1788 na farmaceutike mijenja u prisutnosti mikroplastike (Martyniuk i sur., 2022).



Slika 15. Promjena metaboličkih profila dobivenih PRC analizom u uzorcima tulara izloženim stresorima u odnosu na kontrolu. Vremensku komponentu predstavlja promjena životnih stadija tulara s odvojenim odgovorima u a) mužjaka i b) ženki kod kukuljica nakon 60. dana pokusa, te odraslih jedinki. Brojevi u zagradama označavaju dane izloženosti stresorima.

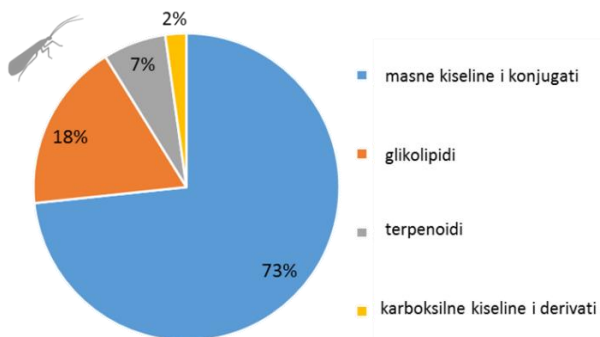
4.2.6. Razlike u mehanizmima obrane od stresa između mužjaka i ženki tulara

U kukuljicama koje su bile pred završetkom procesa metamorfoze te u odraslim jedinkama bilo je moguće odrediti spol, što je omogućavalo praćenje razlika u odgovorima između mužjaka i ženki. Kukuljice mužjaka i ženki (60. dan pokusa) pokazale su najveće razlike u metaboličkim odgovorima u svim tretmanima u usporedbi s kontrolom (Slika 15a i 15b). Dostupna istraživanja uočila su slične obrasce kod kukaca koji su izloženi parazitima, predatorima, kemijskom stresu, utjecajima klimatskih promjena i slaboj kvaliteti hrane (Lindsey i Altizer, 2009; Slos i sur., 2009;

Stillwell i Davidowitz, 2010). Razlike u odgovorima mogu se objasniti različitim evolucijskim ulogama mužjaka i ženki, koje su dovele do razvoja različitih mehanizama za obranu od stresa. U većini istraživanja, ženke su pokazale značajno snažniji odgovor od mužjaka (González-Tokman i sur., 2020; Lindsey i Altizer, 2009; Slos i sur., 2009). Razvoj mehanizama za obranu od stresa može utjecati na smanjivanje fitnesa jedinki. Fitnes ženki usko je vezan uz duljinu života, s kojom raste i broj potomaka, zbog čega im je ulaganje energije u razvoj mehanizama za obranu od stresa isplativo, dok je mužjacima fitnes prvenstveno određen uspjehom parenja (Boots i Begon, 1993; Schmid-Hempel i Ebert, 2003; Slos i sur., 2009). Stoga, u mužjaka je prisutan kompromis između ulaganja u razvoj mehanizama za obranu od stresa, koji im omogućuju dulji životni vijek kao i ulaganja u mehanizme kompeticije koji će im omogućiti veći broj parenja (McKean i Nunnery, 2005).

4.2.7. Promjena u metaboličkim putevima tulara izloženih stresu

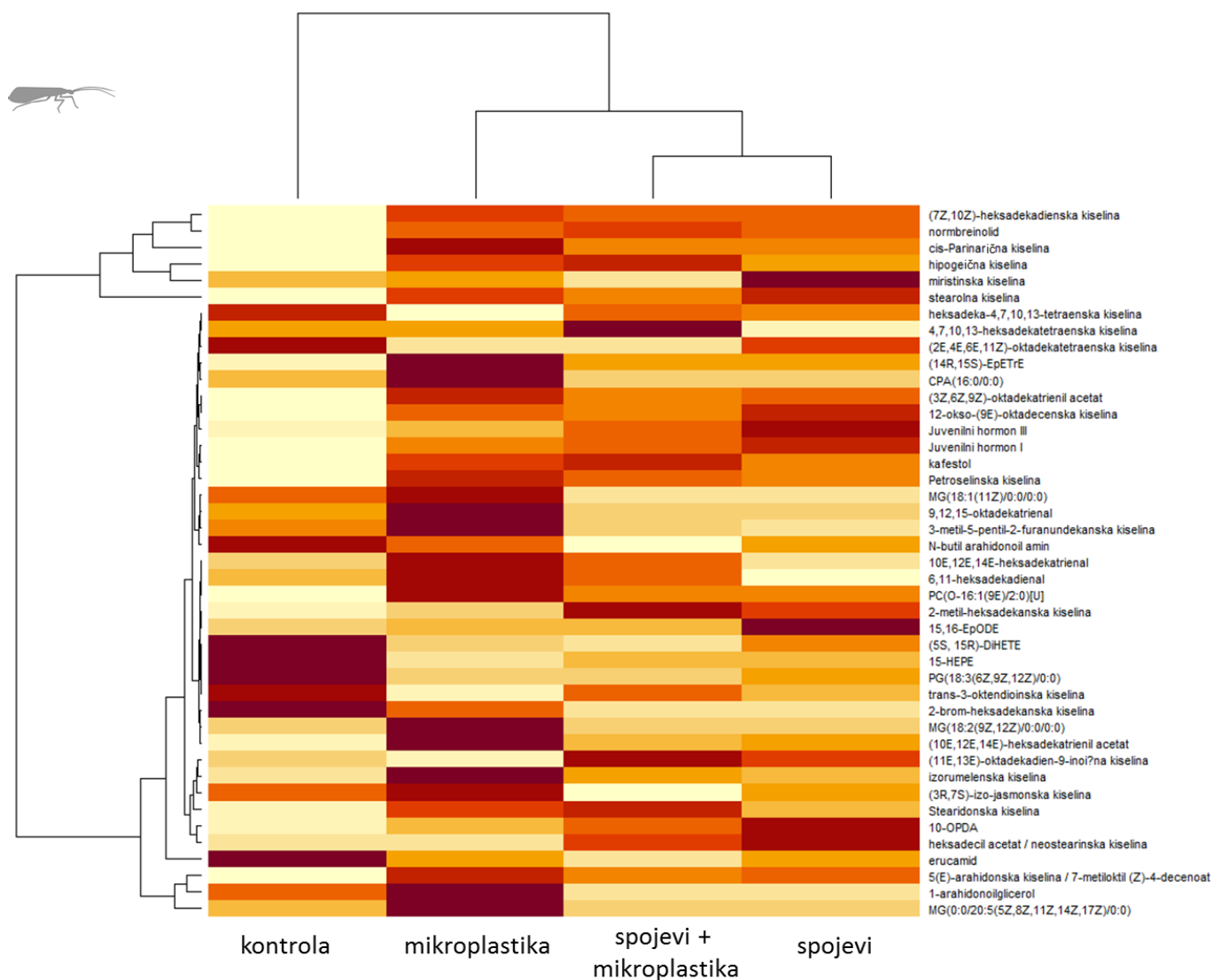
Metaboliti koji pripadaju masnim kiselinama (72% – od kojih 36% čine nezasićene masne kiseline i 9% zasićene), glikolipidima (17%), terpenoidima (7%) i karboksilnoj kiselini (2%) pokazali su najznačajnije promjene prilikom izlaganja učinku mikroplastike, spojeva te njihove kombinacije (Slika 16; Tablica P5). U ovom istraživanju zabilježeno je povećanje stearolne i miristinske kiseline (zasićene masne kiseline) koje je osobito izraženo u ličinkama i predkukuljicama izloženim stresorima (Slika 15). Povećanje miristinske kiseline zabilježeno je kod lisnih uši kada su izložene temperaturnom stresu (Chen i sur., 2005).



Slika 16. Udio skupina metabolita koji su u jedinkama tulara pokazali najznačajniji odgovor na izlaganje stresu u različitim eksperimentalnim tretmanima.

Osim ključne uloge u skladištenju energije, strukturi membrane i fiziološkoj regulaciji beskralježnjaka (Silva i sur., 2017), lipidi su uključeni u većinu metaboličkih puteva zbog čega se često koriste kao bioindikatori (He i Ding, 2020; Tagliaferro i sur., 2022). Promjene u udjelima zasićenih i nezasićenih masnih kiselina kod brojnih organizama upućuju na adaptaciju na zagađenje/onečišćenje, izgladnjivanje i visoke temperature (Fokina i sur., 2013; Guerzoni i sur., 2001; Rocchetta i sur., 2006).

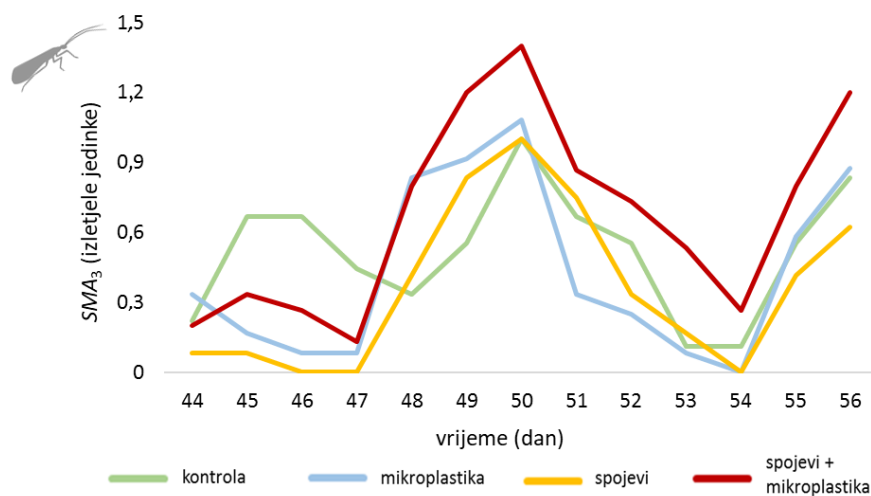
Iz skupine lipida uočili smo promjene u koncentraciji jasmonske kiseline i njenog prekursora 12-okso-fitodienske kiseline (OPDA) (Slika 17). Povećana koncentracija zabilježena je u tularima izloženim tretmanima koji su uključivali spojeve (farmaceutici i endokrini modulatori te kombinacija spojeva i mikroplastike). Jasmonska kiselina i OPDA pripadaju fitohormonima koji igraju glavnu ulogu u obrani biljaka od herbivora usporavajući njihov rast i razvoj (Chen i sur., 2019). Međutim, u mahovini je prisutan samo plastidni dio puta biosinteze jasmonske kiseline koji rezultira nastajanjem prekursora OPDA, dok su geni peroksisomalnog puta odsutni (Monte i sur., 2018). Zbog toga jasmonska kiselina nije detektirana u analiziranim uzorcima mahovine (potpoglavlje 4.2.9). Izvor jasmonske kiseline u našim uzorcima nije poznat, ali se metabolit istog kemijskog sastava kao jasmonska kiselina može sintetizirati u kukcima kao rezultat detoksifikacije OPDA iz uzoraka mahovine (Shabab i sur., 2014).



Slika 17. Odnos koncentracija identificiranih metabolita u tkivima tulara iz različitih eksperimentalnih tretmana prikazan *heat map* analizom. Koncentracije identificiranih metabolita označena je intenzitetom crvene boje, pri čemu jači intenzitet označava višu koncentraciju.

Uz promjene u metabolizmu lipida, uočene su i povišene koncentracije juvenilnih hormona u uzorcima tulara izloženim stresorima (Slika 17). Juvenilni hormoni imaju vrlo važnu ulogu u fiziologiji kukaca budući da sudjeluju u regulaciji rasta, razvoja i reprodukcije kukaca (Wheeler i Nijhout, 2003). Povećanje koncentracije juvenilnog hormona u posljednjem stadiju ličinke utječe na odgađanje metamorfoze uzrokujući dodatno presvlačenje, dok preuranjeni pad u koncentraciji ovog hormona utječe na prerano izlijetanje te pojavu nerazvijenih spolnih organa i krila (Smykal

i sur., 2014). Prema tome, zabilježene povećane koncentracije juvenilnih hormona (I i III) u tularima vjerojatno su dovele do odgođenog razvoja i izlijetanja jedinki tulara izloženih stresorima, što je uočeno i u ovom istraživanju (Slika 18).

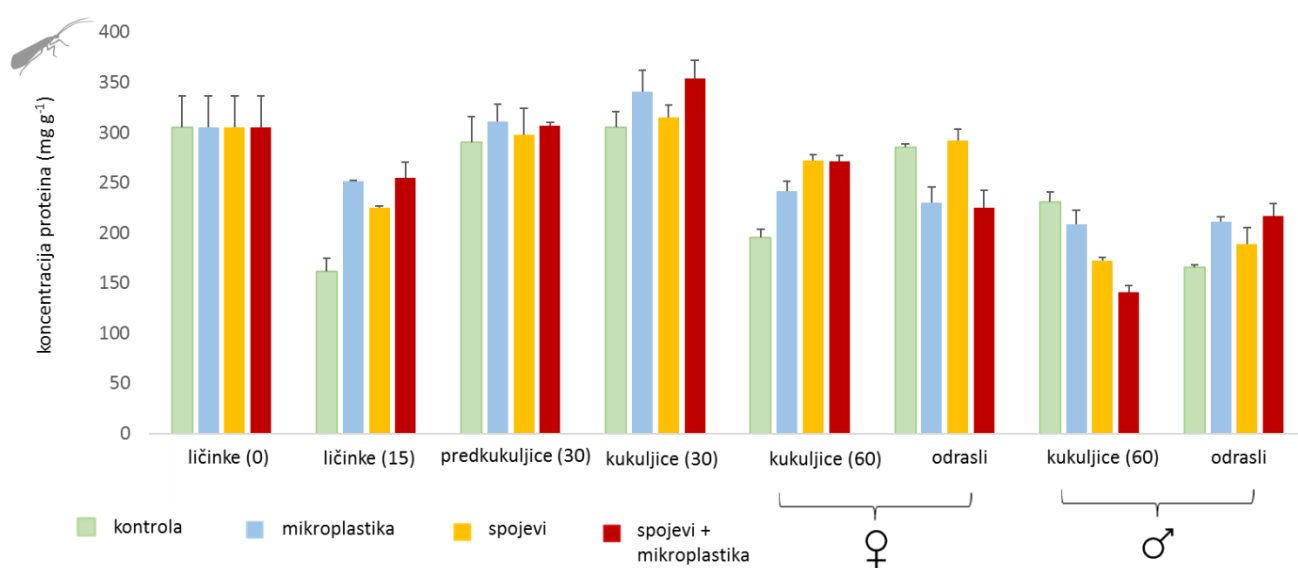


Slika 18. Vremenska dinamika izlijetanja tulara u različitim eksperimentalnim tretmanima izražena jednostavnim pomičnim prosjekom od tri dana.

4.2.8. Ukupna koncentracija proteina u tularima izloženim stresu

Vremenska dinamika ukupne koncentracije proteina u tularima prati sličan obrazac koji je zabilježen u metaboličkim profilima (Slika 19). Značajne razlike uočene su između tretmana, ali i između životnih stadija ($F(3,16) = 4,18$; $p < 0,05$ i $F(5,80) = 61,25$; $p < 0,05$). Također je uočen značajan efekt interakcije tretmana i promjene životnih stadija ($F(15,80) = 2,19$; $p < 0,05$), ukazujući na to da je koncentracija ukupnih proteina u pojedinim tretmanima različita kroz različite razvojne stadije. Značajne razlike ($p < 0,05$) zabilježene su između ličinki uzorkovanih na samom početku pokusa (0. dan pokusa) i onih uzorkovanih nakon 15 dana. Ta razlika vjerojatno je posljedica stresa uzrokovanog promjenom uvjeta u okolišu, odnosno samim pokusom. Osobito velika razlika uočena je u ličinkama uzorkovanim 15. dan pokusa između jedinki izloženih stresorima u odnosu na kontrolne. Povišene koncentracije ukupnih proteina kod životinja izloženih stresu zabilježene su i prethodnim istraživanjima (Browne i sur., 2014; Shen i sur., 2014; Zielińska i sur., 2021). Porast proteina vjerojatno se događa uslijed aktivacije unutarstaničnih obrambenih

mehanizama, temeljenih na proteinima (Browne i sur., 2014; Shen i sur., 2014; Zielińska i sur., 2021). Razlike u koncentraciji ukupnih proteina nisu uočene, vjerojatno zbog nespecifičnog obrambenog mehanizma (Rowley i Powell, 2007). Vremenska dinamika ukupne koncentracije proteina, odnosno povećanje razine proteina (u usporedbi s kontrolnim uzorcima) nakon čega je uslijedio pad koncentracije uočeno je u riba izloženim solima teških metala (HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Gopal i sur., 1997). Mužjaci i ženke su također pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji ukupnih proteina pri čemu su ženke imale značajno višu koncentraciju od mužjaka vjerojatno zbog ulaganja u reproduktivne funkcije (Tojo, 1971).

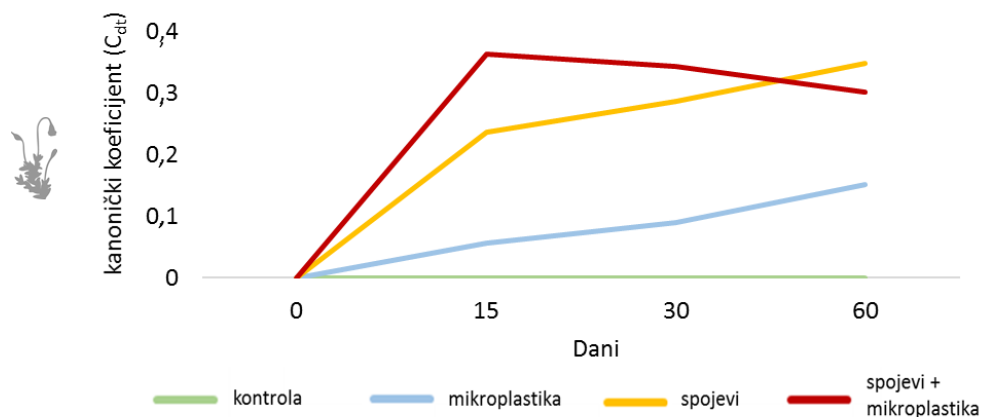


Slika 19. Ukupna koncentracija proteina + standardna pogreška (mg g^{-1}) u životnim stadijima tulara te ženkama i mužjacima iz različitih eksperimentalnih tretmana. Brojevi u zagradama označavaju dane izloženosti stresorima.

4.2.9. Promjena metaboličkog profila u mahovinama izloženim stresu

PRC analiza metaboloma mahovine potvrđuje da je 32% varijance podataka objašnjeno vremenskom komponentom dok je 63% varijance objašnjeno tretmanima. Monte Carlo permutacija pokazala je značajnu ordinaciju za tretmane ($F(98, 6) = 15,08$; $p = 0,001$; svojstvena vrijednost = 1501,20). Za razliku od zabilježenih metaboličkih profila tulara, mahovina nije pokazala značajan metabolički odgovor prilikom izlaganja mikroplastici (Slika 20). Za razliku od mikroplastike, tretmani koji su uključivali spojeve (spojevi te kombinacija spojeva i mikroplastike) uzrokovali su intenzivnije promjene (Slika 20). Ovi rezultati pokazuju da utjecaj stresora na neki organizam u velikoj mjeri ovisi o svojstvima samog organizma. Spojevi, koji su otopljeni u vodi ulaze u tkiva mahovine i tulara te uzrokuju reakciju organizma (Matich i sur., 2019; Previšić i sur., 2020). Za razliku od spojeva, mikroplastika samo zaostaje na površini mahovine, dok je tulari unose u probavni sustav. Unošenje mikroplastike u organizam može dovesti do fizičkih oštećenja i usporavanja probave tulara (Pittura i sur., 2018; Straub i sur., 2017). Prema tome, dobiveni rezultati naglašavaju razlike u odgovorima različitih organizama na isti stresor.

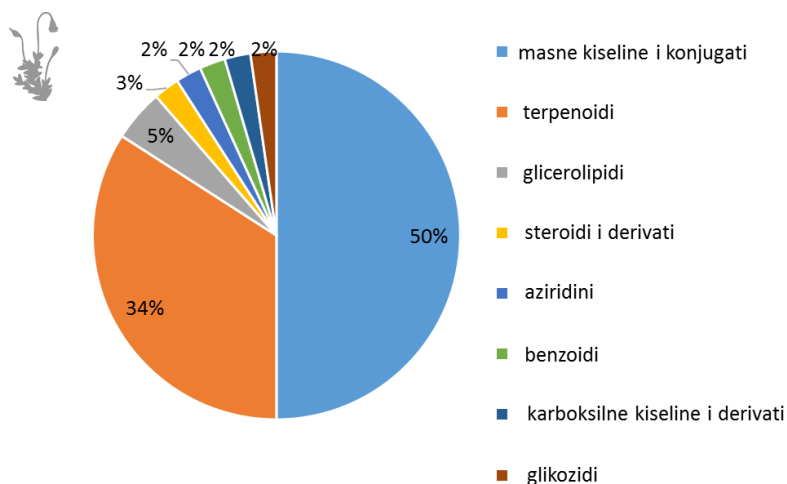
Osim razlike u jačini odgovora postoji razlika i u vremenskoj dinamici odgovora. Mahovina je pokazala intenzivan metabolički odgovor u tretmanima sa spojevima na početku pokusa, nakon čega je uslijedila stabilizacija (Slika 20). S druge strane, uočena je veća varijabilnost metaboličkog odgovora tulara, što upućuje na promjenu osjetljivosti tijekom životnog ciklusa.



Slika 20. Metabolički profili dobiveni PRC analizom u mahovinama izloženim različitim eksperimentalnim tretmanima.

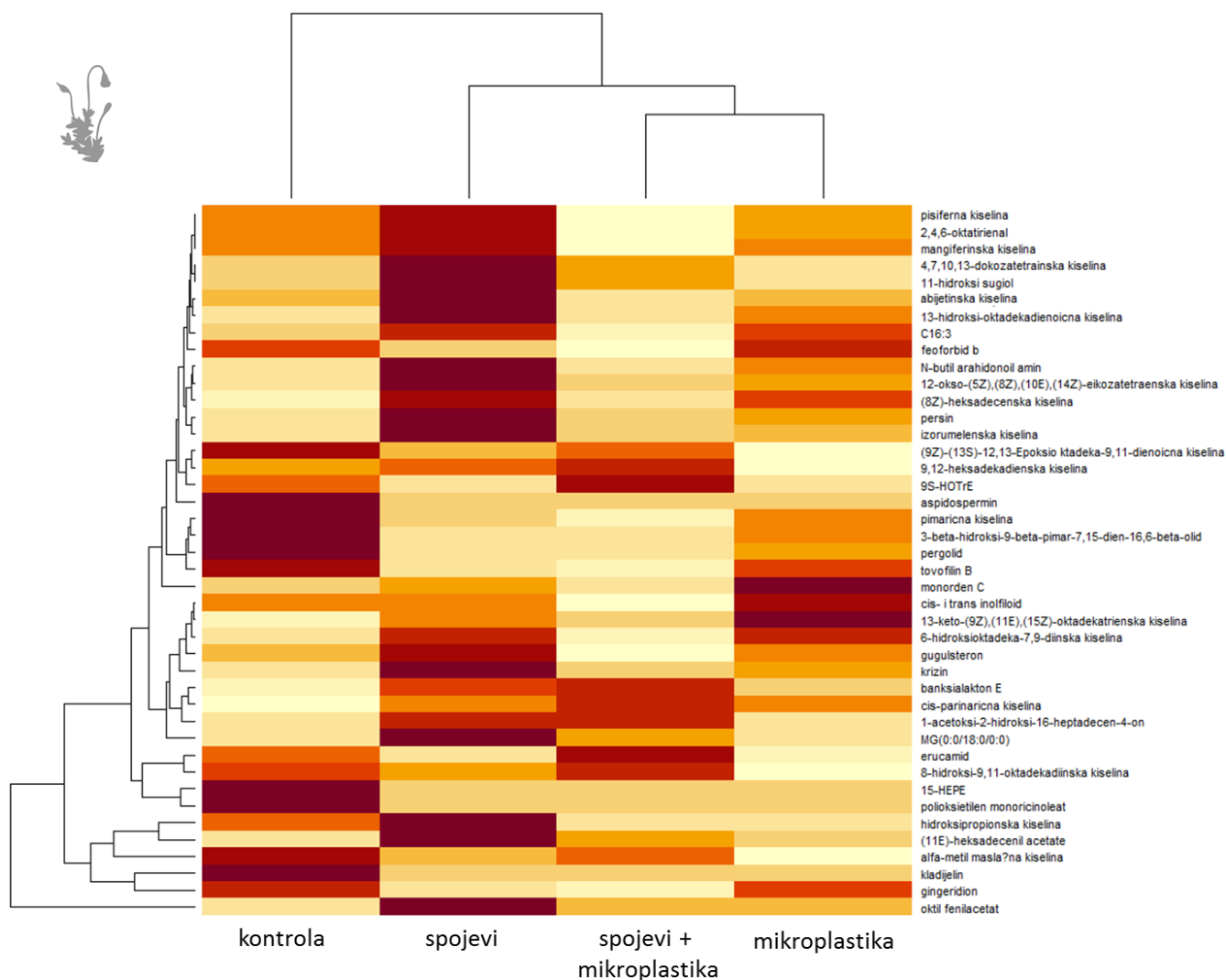
4.2.10. Promjena metaboličkog odgovora mahovine izložene stresu

Masne kiseline i njihovi metaboliti (50%) bili su najzastupljenija skupina metabolita koja je pokazala promjene u mahovinama izloženim stresorima (Slika 21; Tablica P6). Promjene u metabolizmu lipida vjerojatno su, kao i u tularima, odgovor na izlaganje stresorima, s obzirom da masne kiseline i njihovi metaboliti igraju glavnu ulogu u staničnoj regulaciji i signalizaciji odgovora na stres kod biljaka (Okazaki i Saito, 2014). Uočena je promjena u koncentraciji alfa-linolenske kiseline i OPDA, metabolita iz oktadekanoidnog puta koji se odvija u plastidima (Slika 22). OPDA, kao što je već spomenuto (potpoglavlje 4.2.7.), važna je signalna molekula koja sudjeluje u obrani od biljojeda (Shabab i sur., 2014). Međutim, promjene u koncentraciji OPDA u uzorcima izloženim spojevima i kombinaciji spojeva i mikroplastike mogu upućivati na pojačano sintetiziranje OPDA u uvjetima abiotičkog stresa.



Slika 21. Udio skupina metabolita koji su pokazali najveći odgovor u različitim ekperimentalnim tretmanima u mahovinama.

Gemfibrozil, jedan od farmaceutika korištenih u smjesi spojeva (Tablica 3), utječe na metabolizam linolne kiseline (STITCH) (Szkarczyk i sur., 2016) te su zabilježene povišene koncentracije nekoliko metabolita linolne kiseline (15-HEPE, 13R-HODE, 9S-HOTrE, mangiferna kiselina). Nadalje, koncentracija monordena C, koji je inhibitor HSP90 (proteina toplinskog šoka, eng. *heat shock proteins*), bila je izrazito povećana u mahovinama izloženim spojevima i mikroplastici. Nguyen i sur. (2020) pokazali su da monorden C sprječava ili usporava razvoj biljnih bolesti uzrokovanih gljivicama. Osim monordena C uočeno je povećanje koncentracije abijetinske kiseline (skupina terpena) koja se koristi kao biomarker stresa u četinjačama te palmitinske kiseline koja je zabilježena u brojnim biljkama izloženim stresu (Slika 22) (Costa i sur., 2016; Zhukov, 2015).

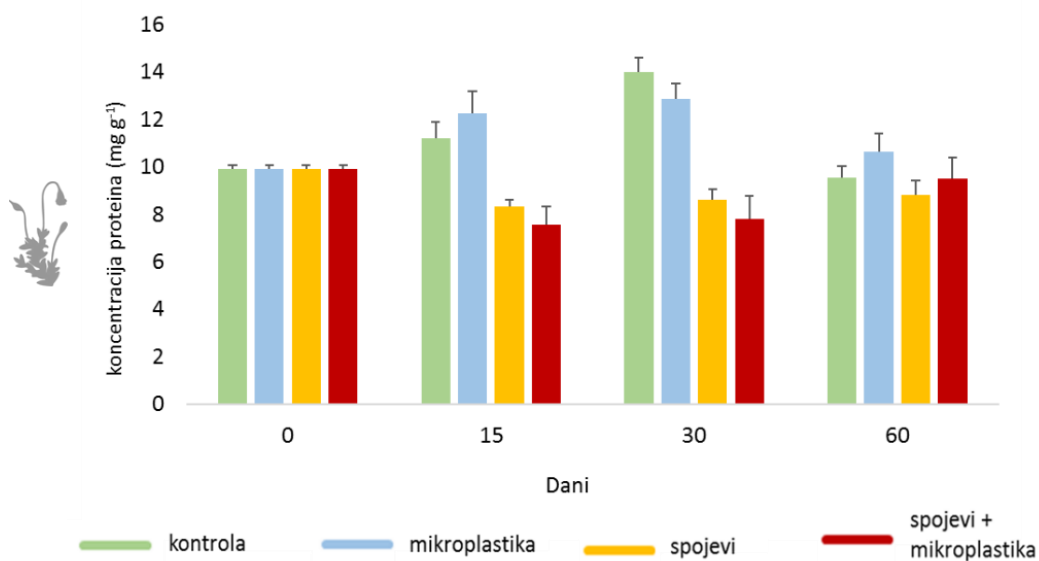


Slika 22. Odnos koncentracija identificiranih metabolita prikazan *heat map* analizom u mahovini iz različitih eksperimentalnih tretmana. Koncentracije identificiranih metabolita označena je intenzitetom crvene boje, pri čemu jači intenzitet označava višu koncentraciju.

4.2.11. Promjena ukupne koncentracije proteina u mahovini izloženoj stresu

Statistički značajna razlika zabilježena je u koncentraciji ukupnih proteina između uzoraka mahovine izloženih stresorima i kontrole ($F(3,8) = 11,71; p < 0,05$), sa značajnim razlikama kod mahovine izložene spojevima te kombinaciji spojeva i mikroplastike (Slika 23). Ovi rezultati razlikuju se od rezultata ukupne koncentracije proteina uočenih u tularima (Slika 19), ali su u

skladu s metaboličkim odgovorima mahovina (Slika 20 i Slika 22). Uočen je značajan učinak tretmana tijekom vremena ($F(9,24) = 6,39$; $p < 0,05$) pri čemu su značajno niže koncentracije ukupnih proteina izmjerene u uzorcima izloženim spojevima te kombinaciji spojeva i mikroplastike. Sličan obrazac uočen je u biljkama koje su izložene niskoj koncentraciji pesticida, dok je izlaganje visokim koncentracijama pesticida uzrokovalo znatan porast razine proteina (Seddiqi i Ahmed, 2006). Takvi rezultati vjerojatno upućuju na smanjenu ekspresiju proteina i/ili pojačanu razgradnju proteina prilikom izlaganja niskim koncentracijama kemijskih tvari, kao što je bilo u našem slučaju, dok visoke koncentracije uzrokuju aktivaciju unutarstaničnih obrambenih mehanizama u mahovini. Međutim, potvrda ovih pretpostavki zahtjeva detaljnu proteomsku obradu.



Slika 23. Ukupna koncentracija proteina u mahovini zabilježena u različitim eksperimentalnim tretmanima tijekom trajanja pokusa.

4.3. Istraživanje utjecaja onečišćenja i suše na raznolikost mikrobne zajednice obraštaja i strukturu metaboloma

4.3.1. Utjecaj vremena kolonizacije i tretmana na sastav obraštaja

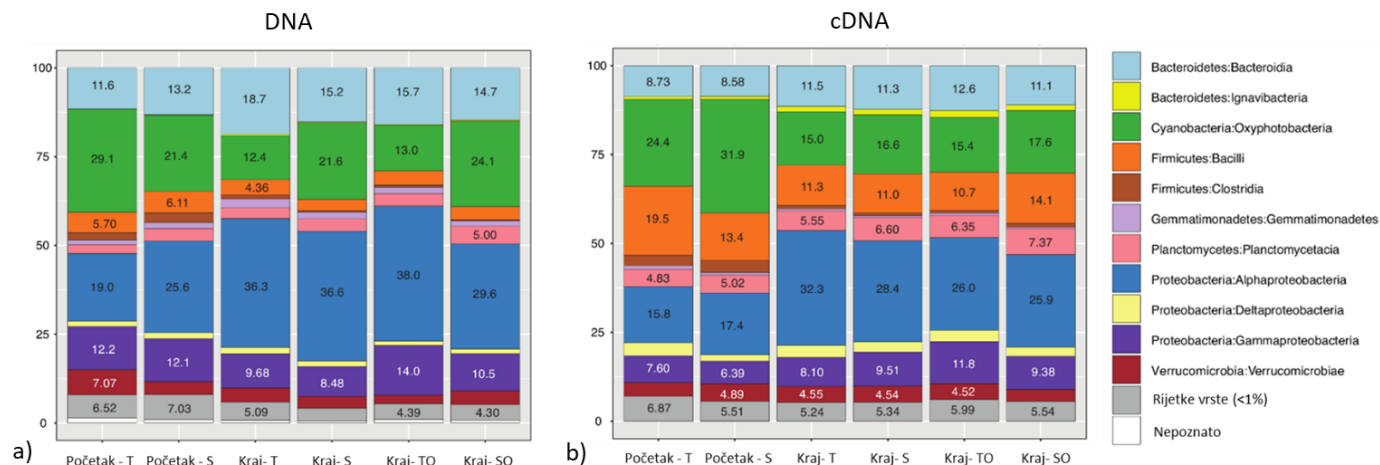
Istraživana je struktura mikrobne zajednice obraštaja praćene u zatvorenom sustavu umjetnih tekućica (Slika 7). Sastav i struktura mikrobne zajednice analizirana je na razini ukupne DNA koja uključuje ukupnu mikrobnu zajednicu (aktivnu, neaktivnu zajednicu i nedavno uginule svojte), te na razini cDNA koja se odnosi samo na aktivne komponente mikrobne zajednice obraštaja (Gionchetta i sur., 2020). Sekvenciranje ciljane V4 regije bakterijskog ribosomalnog gena 16S generiralo je oko 27.723 i 287.584 očitavanja po uzorku. Nakon obrade seta podataka, ukupan broj sekvenci bio je 2.931.656 s 5.811 različitih ASV-ova u ukupno 18 uzorka.

Taksonomskom DNA analizom, u mikrobnoj zajednici obraštaja ukupno je ustanovljeno 29 koljena te 62 razreda, dok je analizom na cDNA razini ustanovljeno 29 koljena i 63 razreda (Tablica P12, P13, P14, P15). Sastav mikrobne zajednice obraštaja bio je sličan u svim provedenim tretmanima na obje analizirane razine (Slika 24). Prema DNA analizi, ustanovljeno je da su u mikrobnoj zajednici najzastupljeniji razredi: Alphaproteobacteria s prosječnom relativnom zastupljenošću od 30,85%, Oxyphotobacteria (koljeno Cyanobacteria) s 20,25% te u manjoj mjeri razredi Bacteroidia (red Bacteroidetes) s 14,85% i Gammaproteobacteria s 11,16% (Slika 24). Na temelju taksonomske analize aktivne cDNA, koja služi za detekciju aktivne komponente mikrobne zajednice, zabilježena je slična struktura zajednice kao na temelju DNA analize (Slika 24), pri čemu su u mikrobnoj zajednici dominirali razredi: Alphaproteobacteria (24,3%), Oxyphotobacteria (20,15%) i Bacteroidia (10,6%). Sastav ukupne i aktivne komponente mikrobne zajednice obraštaja je sličan zajednicama koje nastanjuju prirodne vodotokove (Battin i sur., 2016; Timoner i sur., 2014) te slične eksperimentalne sustave (Subirats i sur., 2018).

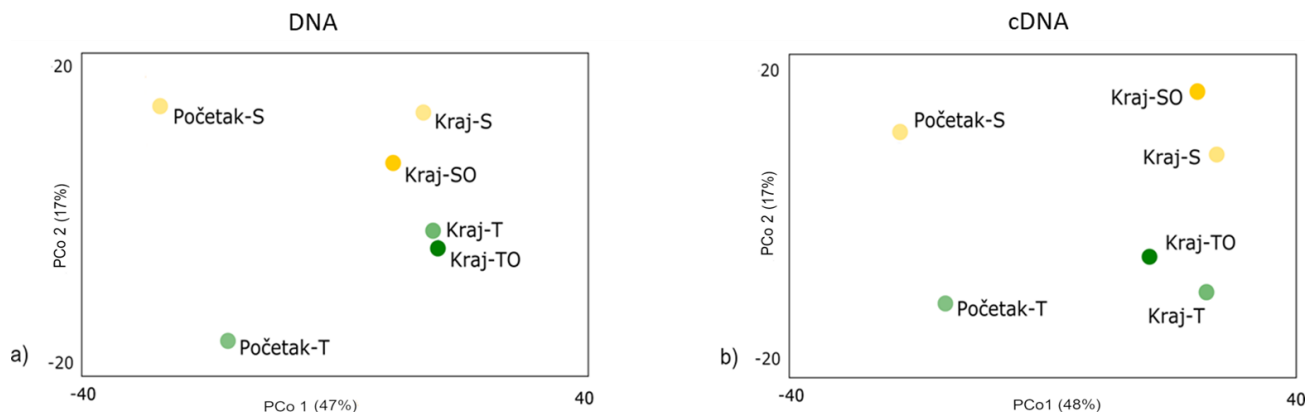
Karakterizacija raznolikosti zajednica nije pokazala statistički značajnu razliku u bogatstvu vrsta koristeći Chao 1 indeks, te u bogatstvu vrsta i ujednačenosti zajednice koristeći Shannon-ov indeks (Tablica P8, P9, P10 i P11), što sugerira da nema značajne promjene u alfa raznolikosti među tretmanima. Poznato je da zajednica obraštaja u slatkovodnim sustavima brzo reagira na poremećaje (Proia i sur., 2013; Sabater i sur., 2007; Subirats i sur., 2018) te je izostanak statističkih

značajnih razlika u raznolikosti bakterijske zajednice na prvi pogled neočekivan. Međutim, pokazano je da tijekom izlaganja obraštaja isušivanju i onečišćenju dolazi do veće promjene zajednici algi u odnosu na bakterijsku zajednicu (Corcoll i sur., 2015). Također je pokazano da su kod povremenih tekućica promjene u bogatstvu vrsta i ujednačenosti mikrobne zajednice povezane s obilježjima slivnog područja tekućice, dok značajke samog riječnog toka i intenzitet isušivanja uvjetuju odgovor na nižim taksonomskim razinama (Giulia Gionchetta i sur., 2020).

Unatoč izostanku odgovora na višoj taksonomskoj razini, na nižoj razini taksonomskih jedinica (vrsta) ukupna i aktivna komponenta mikrobne zajednice obraštaja pokazala je odgovor povezan s vremenom trajanja pokusa i presušivanjem (Slika 25). U PCoA analizi, prva ordinacijska os, koja objašnjava 47% ukupne varijance u slučaju ukupne DNA, te 48% u slučaju cDNA, odvojila je početne uzorke od uzoraka prikupljenih na kraju pokusa, bez obzira na tretmane (Slika 25). Druga ordinacijska os, koja objašnjava 17% varijance u podacima u slučaju ukupne DNA kao i u slučaju cDNA, odvaja uzorke koji su bili izloženi presušivanju, neovisno o izloženosti onečišćenju (Slika 25). Navedeni rezultati odgovaraju prijašnjim istraživanjima koja pokazuju značajan efekt trajanja pokusa na mikrobnu zajednicu obraštaja u sličnim mezokozmos sustavima (Subirats i sur., 2018). Vezano za presušivanje, opaženi efekt je u skladu s *in-situ* rezultatima koji govore o značajnoj promjeni mikrobne zajednice slanih močvara uslijed isušivanja (McKew i sur., 2011). U istom istraživanju opaženo je da ponovna uspostava normalnog hidrološkog režima nije dovela do uspostave početnog sastava mikrobne zajednice nego do daljnjih promjena u njenoj strukturi što donekle odgovara efektima opaženim u pokusu gdje tijekom oporavka mikrobne zajednice obraštaja nije došlo do grupiranja zajednica povezanih sa stalnim tokom i presušivanjem. Onečišćenje farmaceutski aktivnim spojevima nije uzrokovalo promjene u sastavu mikrobne zajednice tijekom oporavka od stresa presušivanja što govori da je presušivanje u ovom pokusu bilo dominantni stresor. Moguće je da je izloženost obraštaja presušivanju povećalo toleranciju mikrobne zajednice na djelovanje farmaceutski aktivnih spojeva. Takav obrazac je primijećen prilikom izlaganja bakterija stresnim događajima kao što su promjena temperature, ograničenje hranjivih tvari, prisutnost slobodnih radikala itd. (Bernier i Surette, 2013). S druge strane, moguće je da je primijenjena koncentracija farmaceutski aktivnih spojeva bila preniska da bi utjecala na promjenu sastava zajednice.



Slika 24. Bakterijske svojte prisutne u mikrobnoj zajednici izloženoj različitim eksperimentalnim tretmanima (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa) prikazane su na razini razreda kao udjeli u a) ukupnoj (DNA) i b) aktivnoj (cDNA) zajednici. Prikazani su razredi zastupljenosti >1%, dok su razredi s manjom zastupljenošću grupirane u kategoriju „rijetke vrste“.

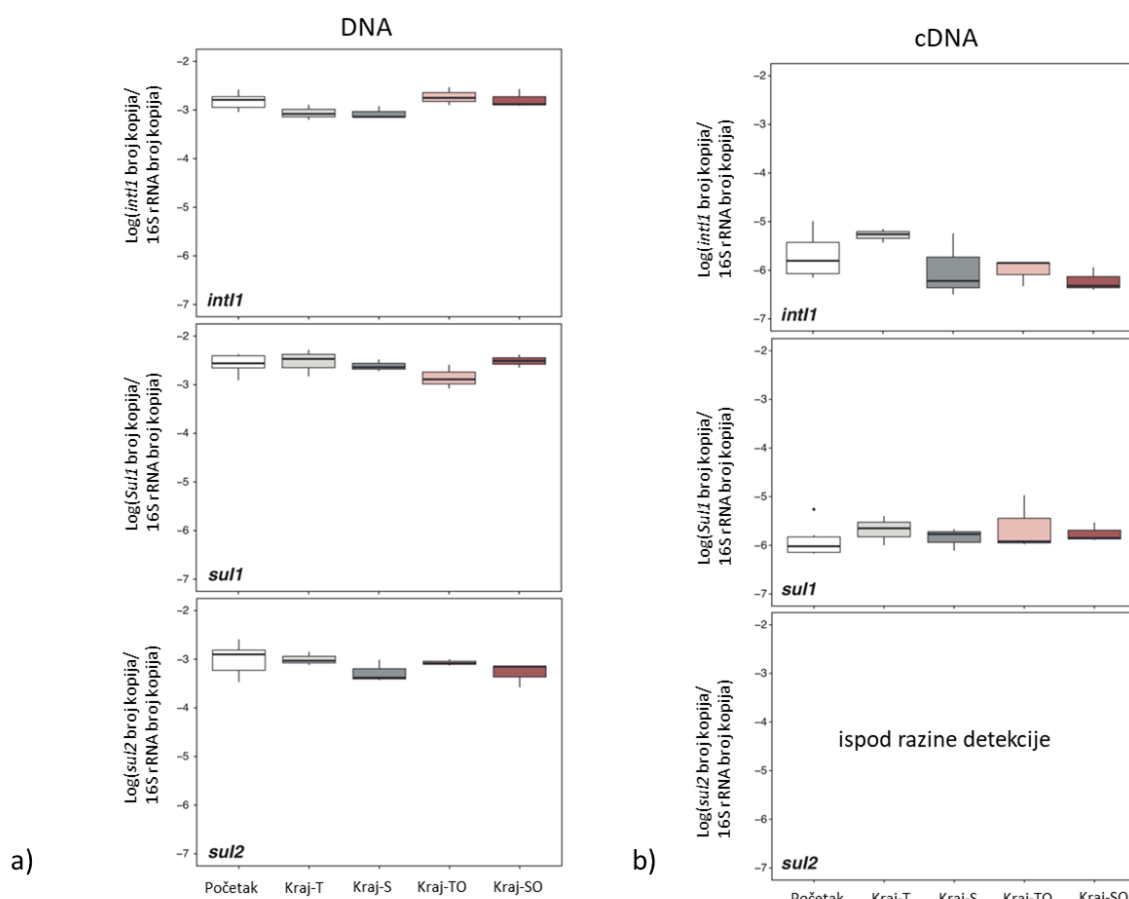


Slika 25. Prikaz PCoA ordinacije a) analiza ukupne DNA i b) analiza cDNA mikrobne zajednice obrađaja prilikom izlaganja različitim eksperimentalnim tretmanima: Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa. Zelenom bojom je označen je obrađaj u uvjetima stalnog toka, dok je žutom bojom prikazan obrađaj izložen presušivanju.

4.3.2. Utjecaj onečišćenja na ekspresiju gena za bakterijsku rezistenciju na antibiotike u obraštaju

Prisutnost farmaceutski aktivnih spojeva nije uzrokovala promjene u sastavu mikrobne zajednice obraštaja što može govoriti da je primijenjena koncentracija farmaceutski aktivnih spojeva niska. Međutim, nađeno je da niže koncentracije farmaceutski aktivnih spojeva, posebice antibiotika, ne uzrokuju staničnu smrt već mogu uzrokovati stres i pokrenuti cijelu kaskadu molekularnih procesa koji između ostalog uključuju ekspresiju gena povezanih s otpornošću na antibiotike (Giulia Gionchetta i sur., 2020). S obzirom na to da su za simulaciju utjecaja onečišćenja između ostalih spojeva korištena i dva antibiotika: sulfisoksazol (klasa sulfonamida) i eritromicin (klasa makrolida), kvantificirani su geni i ekspresija gena koji kodiraju enzime povezane s otpornošću gram-negativnih bakterija otpornih na sulfonamide (*sul1* i *sul2*) i otpornošću gram-pozitivnih bakterija na makrolide (*ermB*). Također je kvantificiran gen i ekspresija gena integron-integrase klase 1 (*intI1*) koji služi kao pokazatelj antropogenog onečišćenja i horizontalnog prijenosa gena (Gillings i sur., 2015; Stalder i sur., 2014). Prisutnost gena *intI1*, *sul1*, *sul2* uočena je u svim uzorcima dok je količina gena *ermB* bila ispod razine detekcije (56 kopija μL^{-1} , Slika 26a). Međutim, nisu uočene statistički značajne razlike u relativnim koncentracijama gena među različitim tretmanima (*intI1* - $F(4, 10) = 2,92$; $p > 0,05$, *sul1* - $F(4,10) = 1,12$; $p > 0,05$, *sul2* - $F(4, 10) = 0,9$; $p > 0,05$) što sugerira da tretmani nemaju značajan utjecaj na koncentraciju gena povezanih s otpornošću na antibiotike. Geni *intI1* i *sul1* imali su približno tri reda veličine smanjenu ekspresiju dok je količina eksprimiranog gena *sul2* bila ispod razine detekcije (75 kopija μL^{-1} , Slika 26b). Navedeno ukazuje da, iako mikrobna zajednica prisutna u obraštaju posjeduje genetski potencijal povezan s otpornošću na antibiotike, isti nije bio izražen u uvjetima provođenja pokusa što sugerira da je primijenjena koncentracija antibiotika bila preniska ili da je međudjelovanje stresora negativno djelovalo na ekspresiju navedenih gena (Bernier i Surette, 2013). Prethodna istraživanja koja su izlagala mikrobnu zajednicu obraštaja utjecaju antibiotika u sličnoj koncentraciji također ukazuju na izostanak promjene u koncentraciji gena povezanih s otpornošću na antibiotike (Subirats i sur., 2018). Međutim, navedeno istraživanje ukazuje na interakciju između koncentracije gena i stresa povezanog s dostupnom količinom hranjivih tvari (simuliranom kao različite koncentracije fosfata, nitrata i amonijaka) (Subirats i sur., 2018). U

ovom radu potencijalno međudjelovanje stresora možemo isključiti jer nisu uočene statistički značajne razlike u relativnim koncentracijama gena niti je došlo do njihovog ekspresije.

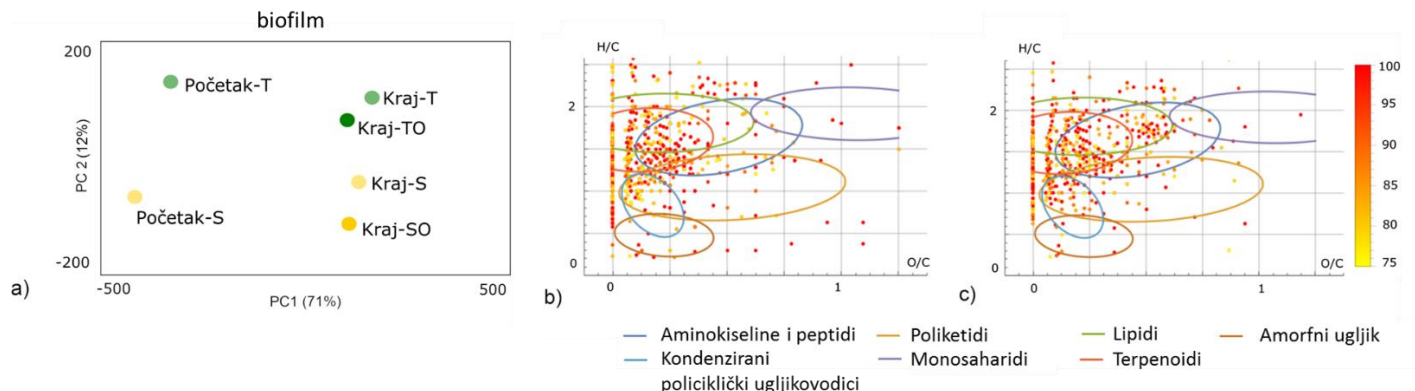


Slika 26. Relativna zastupljenost ciljanih gena za antibiotsku rezistenciju i antropogeni stres u bakterijskim DNA i RNA uzorcima obrađaja izloženim onečišćenju, presušivanju i njihovoj kombinaciji. Početak – kompozitni početni uzorak iz svih tretmana; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa.

4.3.3. Utjecaj vremena kolonizacije i presušivanja na metabolom mikrobne zajednice u obraštaju

PC analiza pokazuje da varijancu u podacima metaboloma mikrobne zajednice najviše objašnjava vrijeme kolonizacije (71%) i presušivanje (12%). Za vrijeme kolonizacije, najveća aktivnost uočena je među terpenoidima i poliketidima (prikazano Van Krevelenovim dijagramima, Slika 27b). S druge strane, aktivnost lipida i terpenoida izmijenjena je u uzorcima izloženima suši u odnosu na početne uzorke (Slika 27c). Lipidi i terpenoidi imaju važnu ulogu u biosintezi stanične stijenke, regulaciji procesa koji se odvijaju na staničnoj membrani te u skladištenju energije (De Carvalho i Caramujo, 2018; Tholl, 2006), dok terpenoidi sudjeluju i u transportu elektrona te pretvaranju svjetlosne energije u kemijsku, što utječe na rast prokariotskih organizama (Boronat i Rodríguez-Concepción, 2015). Također, dosadašnja istraživanja pokazuju da funkcionalna sinteza poliketida doprinosi stvaranju obraštaja (Pang i sur., 2012), što odgovara aktivaciji poliketida uočenoj prilikom kolonizacije obraštaja (Slika 27b).

Prokariotski terpenoidi također igraju važnu ulogu u obrani od stresa (Boronat i Rodríguez-Concepción, 2015). Prethodnim istraživanjima je pokazano da terpenoidi koji se nalaze na staničnoj membrani sudjeluju u obrani stanica od okolišnog stresa (Dempster i Sommerfeld, 1998; Rosselló-Mora i sur., 2008; Serra-Compte i sur., 2018a). U ovom istraživanju vidljiva je jasna aktivnost molekula alifatske strukture, poput derivata karboksilne kiseline (karnitin, acetilkarnitin i azelainska kiselina), što na Van Krevelenovom dijagramu odgovara presjeku između područja lipida, aminokiselina i peptida (Slika 27b i 27c). Bakterije koriste karnitin i acetilkarnitin kao osmoprotektore i/ili osmolite (Meadows i Wargo, 2015), dok se prisutnost azeleiske kiseline povezuje s obranom od presušivanja (Serra-Compte i sur., 2018a). Povećana aktivnost aminokiselina/peptida prilikom izlaganja suši može se povezati s njihovom ulogom osmoprotektora, s obzirom da je prethodnim istraživanjima zabilježeno da povećana koncentracija aminokiselina u citoplazmi pomaže mikroorganizmima prevenirati isušivanje stanica (Kol i sur., 2010).

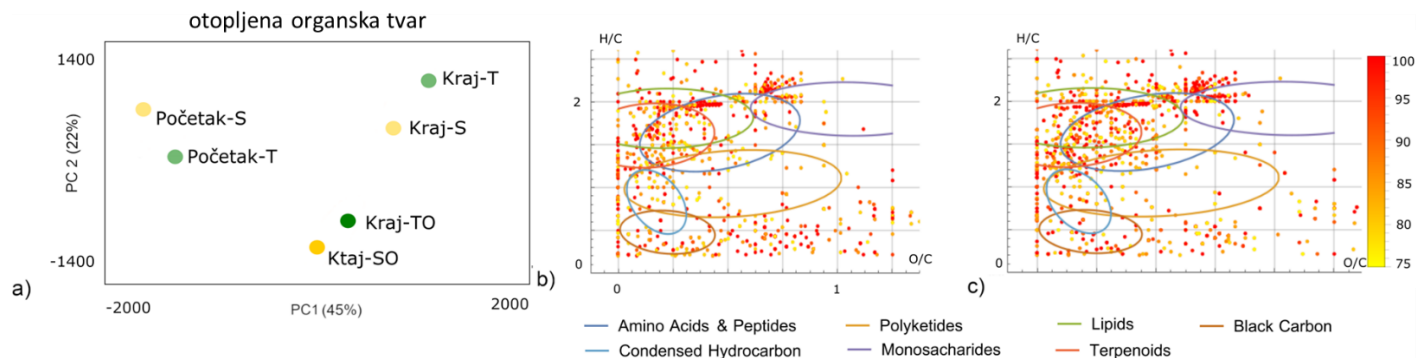


Slika 27. a) PCA ordinacija uzoraka metaboloma mikrobne zajednice izložene različitim eksperimentalnim tretmanima: Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa. Van Krevelenovim dijagramima prikazana je struktura metabolita koji su najviše pridonijeli odvajanju uzoraka u mikrobnoj zajednici: b) na prvoj ordinacijskoj osi (PC1) koja značajno odražava utjecaj vremena kolonizacije te c) na drugoj ordinacijskoj osi (PC2) koja značajno odražava utjecaj presušivanja. Intenzitet narančaste u boje Van Krevelenovim dijagramima označava utjecaj pojedinog metabolita u odvajanju uzoraka u PCA ordinaciji, pri čemu jači intenzitet označava jači utjecaj metabolita na odvajanje uzoraka. Zelenom bojom označen je obraštaj u uvjetima stalnog toka, dok je žutom bojom prikazan obraštaj izložen presušivanju.

4.3.4. Utjecaj vremena kolonizacije i onečišćivala na promjene u sastavu otopljene organske tvari u obraštaju

Slično kao i u slučaju metaboloma mikrobne zajednice, varijanca u podacima otopljene organske tvari u obraštaju većinski je objašnjena vremenom kolonizacije (45%), pri čemu se jasno odvajaju uzorci obraštaja prikupljeni na početku i na kraju pokusa (Slika 28a). Iz Van Krevelenovog dijagrama je vidljivo da se promjene u metaboličkim profilima uzrokovane vremenom kolonizacije najviše očituju kroz promjene u koncentracijama poliketida, lipida i aminokiselina (Slika 28b). Zabilježena je pojačana aktivnost amorfnog ugljika i kondenziranih policikličkih ugljikovodika te aktivnost spojeva koji se nalaze na presjeku između područja lipida, aminokiselina i peptida te monosaharida (Slika 28b). Amorfni ugljik i kondenzirani policiklički ugljikovodici su dio

slatkovodnih ekosustava (Antony i sur., 2017; Coppola i sur., 2018), a u sustav umjetnih tekućica vjerojatno su uneseni zajedno sa sedimentom koji je korišten kao supstrat za kolonizaciju obraštaja. Opaženo je da mikrobna zajednica može utjecati na njihovu razgradnju (Antony i sur., 2017; Hockaday i sur., 2006), što je vjerojatno uzrok promjene u koncentracijama ovih metabolita. Budući da je otopljena organska tvar usko vezana uz procese koji se odvijaju u obraštaju (nastajanje, trošenje i promjena uslijed ispuštanja metabolita iz mikrobne zajednice u vodu), očekivano je da će pokazivati slične obrasce kao i mikrobna zajednica. Iako je vrijeme kolonizacije značajno utjecalo na otopljenu organsku tvar, kao i na mikrobnu zajednicu u obraštaju, različite skupine metabolita pokazali su razlike između uzoraka iz kontrole i tretmana. Povećana aktivnost uočena u presjeku zona lipida, aminokiselina i peptida te monosaharida vjerojatno odražava izmjenu metabolita i enzima, otpadnih spojeva, signalnih molekula i hranjivih tvari između bakterijskih stanica unutar obraštaja i okoliša (Smith i sur., 2019). Uz vrijeme kolonizacije, izloženost onečišćenju objašnjava 22% varijacije u podacima (Slika 28). Najveća promjena u profilu otopljene organske tvari uočena je u području lipida, aminokiselina i peptida te monosaharida (Slika 28c). Poznato je da bakterije izlučuju određene metabolite u okolni medij (Lu i sur., 2019), te su Smith i sur. (2019) pretpostavili da obraštaj reagira na kemijski stres izlučivanjem izvanstaničnih enzima. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja koja bi razjasnila promjene u sastavu i strukturi otopljene organske tvari u vodi prilikom izlaganja onečišćivačima.



Slika 28. a) PCA ordinacija otopljene organske tvari u različitim eksperimentalnim tretmanima: Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa. Van Krevelenovim dijagramima prikazana je struktura metabolita koji su najviše pridonijeli odvajanju uzoraka: b) na prvoj ordinacijskoj osi (PC1) koja značajno odražava utjecaj vremena kolonizacije te c) na drugoj ordinacijskoj osi (PC2) koja značajno odražava utjecaj izlaganja onečišćenju. Intenzitet narančaste u boje Van Krevelenovim dijagramima označava utjecaj pojedinog metabolita u odvajanju uzoraka u PCA ordinaciji, pri čemu jači intenzitet označava jači utjecaj metabolita na odvajanje uzoraka. Zelenom bojom označen je obraštaj u uvjetima stalnog toka, dok je žutom bojom prikazan obraštaj izložen presušivanju.

4.3.5. Unutarstanični odgovor obraštaja na presušivanje i onečišćenje

Rezultati dobiveni analizom metaboloma mikrobne zajednice obraštaja prikazani Van Krevelenovim dijagramom (Slika 27c) vjerojatno su posljedica pokretanja mehanizama odgovornih za zadržavanje vode unutar stanica obraštaja. Bakterije sintetiziraju ili unose u stanicu osmoprotektore koji utječu na povećanje osmotskog tlaka unutar stanica (Meadows i Wargo, 2015; Wood i sur., 2001). Najčešći osmoprotektori su elektroliti (npr. K^+), derivati karboksilne kiseline te aminokiseline i njihovi derivati. Povećana aktivnost spojeva koji se nalaze u presjeku između lipida, aminokiseline i peptida (Slika 27c) može se povezati promjenama u koncentraciji derivata karboksilne kiseline kao što su karnitin, acetilkarnitin i azelaična kiselina. Također, uočeno je da i sami lipidi i aminokiseline imaju zaštitnu ulogu u sprječavanju isušivanja stanica (Kol i sur., 2010). Suša koja je u ovom istraživanju trajala pet dana vjerojatno je utjecala na pokretanje mehanizama

koji imaju ulogu u zadržavanju vode unutar stanica. Ponovnom uspostavom toka, osmoprotektori sintetizirani u stanicama djelomično se izlučuju u okoliš. Međutim, taj proces prema Wood i sur. (2001) traje vrlo kratko (<60 s). S druge strane, vremenska rezolucija provedenog mjerenja je puno dulja (24h), što može objasniti činjenicu da nisu detektirane povećane koncentracije osmoprotektora analizom otopljene organske tvari u vodi. Međutim, prethodnim istraživanjem uočeno je da se veći dio osmoprotektora zadržava u stanicama (Wood i sur., 2001) te je u ovom istraživanju uočen obrazac promjene koncentracije metabolita koji odgovaraju osmoprotektorima u uzorcima obraštaja izloženim suši (Slika 27c).

Mikrobna zajednica u obraštaju nije pokazala metaboličke promjene prilikom izlaganja onečišćenju. Ovaj rezultat vjerojatno je posljedica korištenja niskih koncentracija onečišćivala, koji osim na metabolom nisu imali utjecaj na promjenu sastava ukupne i aktivne komponente obraštaja, niti su povećali ekspresiju gena za rezistenciju na antibiotike. Lu i sur. (2019) izlagali su mikrobnu zajednicu smjesi antibiotika u okolišno značajnim koncentracijama. Niske koncentracije nisu utjecale na promjenu u replikaciji, translaciji, transkripciji i staničnoj proliferaciji bakterijskih stanica. Nadalje, u istraživanju koje je pratilo utjecaj presušivanja u kombinaciji s lijekovima, presušivanje je, kao i u našem istraživanju, bilo dominantni stresor (Serra-Compte i sur., 2018a). S obzirom na to da je sastav metabolita koje bakterije izlučuju u okoliš prilikom kemijskog stresa neistražen, za sada nije moguće u potpunosti objasniti zabilježene obrasce. Međutim, poznato je da bakterije izlučuju izvanstanične enzime koji razgrađuju kompleksne polisaharide i proteine (Smith i sur., 2019) pa prema tome postoji mogućnost da je odgovor bakterija na onečišćivala u okolišu također izvanstanični, što je potrebno potvrditi daljnim istraživanjima.

5. ZAKLJUČCI

i) **Razvoj metode za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala, metabolita i proteina iz okolišnih uzoraka**

U ovom je radu razvijena sveobuhvatna metoda za istovremenu izolaciju i detekciju onečišćivala (farmaceutski aktivnih spojeva, endokrinih modulatora i mikroplastike) te metabolita i proteina iz jednog uzorka tkiva. Protokol je temeljen na ekstrakciji organskim otapalima te dodatnim pročišćavanjem putem ekstrakcije u čvrstoj fazi. Pokazano je da odabir kolone za pročišćavanje u čvrstoj fazi utječe na vrijeme obrade uzorka, iskoristivost te na kvalitetu dobivenih signala onečišćivala. Kolone Oasis HLB omogućuju dobivanje jasnijih signala i veće iskoristivosti dok kolone Oasis HLB Prime zbog manjeg broja koraka u protokolu skraćuju vrijeme za obradu uzoraka, što ove kolone čini pogodnom za korištenje u istraživanjima s velikim brojem uzoraka u kojima je cilj utvrditi obrasce ponašanja pojedinih spojeva. Sveukupna učinkovitost razvijenog protokola za simultanu izolaciju onečišćivala, metabolita i proteina u skladu je s učinkovitošću dosadašnjih protokola za pojedinačnu obradu uzoraka, što je rezultiralo manjim utroškom vremena i tkiva potrebnog za analizu. Čak i kada količina uzorka nije problem, dobra strana ove metode je izvođenje višestrukih mjerenja na istom uzorku, čime se smanjuje varijabilnost poduzoraka, štedi vrijeme i smanjuju troškovi eksperimenta. Razvijena metoda omogućuje integraciju informacija o stresu dobivenih na molekularnoj razini (metaboliti i proteini) s kvantitativno određenim razinama onečišćivala u organizmima te pruža slojevitiji, potpuniji i informativniji pogled na procese koji se odvijaju u okruženjima pod djelovanjem višestrukih stresora. Razvijena metoda korištena je za praćenje stresora kao i molekularnih odgovara organizama istraživanih u ovom rada.

ii) **Istraživanje utjecaja mikroplastike, farmaceutika i endokrinih modulatora na strukturu metaboloma i proteoma mahovine i tulara**

Rezultati mezokosmos eksperimenta u kojem je pojednostavljeni slatkovodni ekosustav izložen djelovanju mikroplastike i farmaceutika, pokazuju da vodeni organizmi igraju važnu ulogu u kruženju mikroplastike u slatkovodnim ekosustavima. Makrofiti iz skupine mahovina imaju sposobnost uklanjanja mikroplastike iz vodenog stupca, no pritom postaju vektori za prijenos mikroplastike kroz hranidbene mreže. Hranjenjem mahovinom tulari unose čestice mikroplastike u svoj organizam, pri čemu većina čestica prolazi kroz njihovo probavilo. Dio čestica se ipak zadržava u organizmu te prenosi dalje kroz životne stadije tulara, s time da se broj čestica

progresivno smanjuje u svakom sljedećem životnom stadiju. Međutim, ne dolazi do potpunog uklanjanja čestica te se prilikom izlijetanja manji dio mikroplastike prenosi iz vodenog u kopneni ekosustav. Tijekom izlaganja česticama mikroplastike, mahovine pokazuju blagu reakciju na stres, dok tulari pokazuju razine stresa usporedive s izlaganjem farmaceuticima i endokrinim modulatorima. Do navedene razlike u reakcijama najvjerojatnije dolazi zbog toga što se kod makrofita mikroplastika zadržava samo na vanjskoj površini dok kod tulara ulazi u organizam. Prilikom djelovanja kombinacije stresora, u početnim fazama izloženosti zabilježen je sinergijski učinak, kako kod tulara tako i kod mahovine. Na molekularnoj razini vidljive su promjene u regulaciji pojedinih metabolita (većinom lipida) te u ukupnom sadržaju proteina. S druge strane, na makroskali promjene uzrokovane stresom i višestrukim stresom uzrokuju odgođenu emergenciju tulara.

iii) Istraživanje utjecaja onečišćenja i suše na raznolikost mikrobne zajednice i strukturu metaboloma u obraštaju

Pokusom u sustavu umjetnih tekućica utvrđeno je dinamičko međudjelovanje mikrobne zajednice obraštaja i okoliša tijekom izlaganja stresu uzrokovanom presušivanjem i farmaceuticima. Vrijeme inkubacije, kao i stres uzrokovan presušivanjem, oblikovali su zajednicu obraštaja i njezin metabolom. S druge strane, stres uzrokovan smjesom onečišćivala nije utjecao na mikrobnu zajednicu obraštaja niti na njezin metabolom. Prilikom izlaganja višestrukom stresu nisu primijećene značajnije promjene u odnosu na učinke stresa presušivanja. Međutim, opaženo je da obraštaj pod utjecajem onečišćenja mijenja kemijski sastav otopljene organske tvari sustava umjetnih tekućica, dok promjene u sastavu otopljene organske tvari nisu povezane sa stresom presušivanja. Analiza metaboloma obraštaja sugerira da stres presušivanja aktivira mehanizme povezane s oksidativnim stresom i zadržavanjem vode unutar stanice. S druge strane, promjene u sastavu otopljene organske tvari upućuju da bakterijska zajednica vjerojatno izlučuje određene spojeve kao odgovor na pritisak smjese onečišćivala. Sukladno tim rezultatima te identificiranim klasama metabolita, iznesena je pretpostavka da je presušivanje dominantni stresor te da je odgovor obraštaja na presušivanje unutarstanični, dok je odgovor na kemijsko onečišćenje izvanstanični.

6. POPIS LITERATURE

- Afonso-Olivares, C., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2016. Analytical tools employed to determine pharmaceutical compounds in wastewaters after application of advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 24476–24494. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7325-6>
- Alekseyev, Y.O., Fazeli, R., Yang, S., Basran, R., Maher, T., Miller, N.S., Remick, D., 2018. A next-generation sequencing primer—how does it work and what can it do? *Acad. Pathol.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1177/2374289518766521>
- Allwood, J.W., Williams, A., Uthe, H., van Dam, N.M., Luis, L.A.J., Grant, M.R., Pétriacq, P., 2021. Unravelling plant responses to stress—the importance of targeted and untargeted metabolomics. *Metabolites* 11. <https://doi.org/10.3390/metabo11080558>
- Altshuler, I., Demiri, B., Xu, S., Constantin, A., Yan, N.D., Cristescu, M.E., 2011. An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. *Integr. Comp. Biol.* 51, 623–633. <https://doi.org/10.1093/icb/icr103>
- Alvarez-Muñoz, D., Huerta, B., Fernandez-Tejedor, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2015. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta* 136, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.035>
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., Castro, M.D.L. de, 2010. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.004>
- Amoatey, P., Baawain, M.S., 2019. Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water Environ. Res.* 91, 1272–1287. <https://doi.org/10.1002/wer.1221>
- Antony, R., Willoughby, A.S., Grannas, A.M., Catanzano, V., Sleighter, R.L., Thamban, M., Hatcher, P.G., Nair, S., 2017. Molecular Insights on Dissolved Organic Matter Transformation by Supraglacial Microbial Communities. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4328–4337. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05780>

- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 257–297. <https://doi.org/10.1139/A06-005>
- Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.C., Dagot, C., Labanowski, J., 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* 579, 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136>
- Azzouz, A., Souhail, B., Ballesteros, E., 2011. Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 84, 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.016>
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq167>
- Barreales-Suárez, S., Callejón-Mochón, M., Azoulay, S., Bello-López, M.Á., Fernández-Torres, R., 2018. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry determination of six pharmaceuticals in vegetal biota. Uptake study in *Lavandula dentata*. *Sci. Total Environ.* 622–623, 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.244>
- Bates, A.L., Pickup, M.W., Hallett, M.A., Dozier, E.A., Thomas, S., Fingleton, B., 2015. Stromal matrix metalloproteinase 2 regulates collagen expression and promotes the outgrowth of experimental metastases. *J. Pathol.* 235, 773–783. <https://doi.org/10.1002/path.4493>
- Battin, T.J., Besemer, K., Bengtsson, M.M., Romani, A.M., Packmann, A.I., 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- Beermann, A.J., Elbrecht, V., Karnatz, S., Ma, L., Matthaei, C.D., Piggott, J.J., Leese, F., 2018. Multiple-stressor effects on stream macroinvertebrate communities: A mesocosm experiment manipulating salinity, fine sediment and flow velocity. *Sci. Total Environ.* 610–611, 961–971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.084>
- Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Boldrocchi, G., Bettinetti, R., 2021. The extraction of

- microplastics from sediments: An overview of existing methods and the proposal of a new and green alternative. *Chemosphere* 278, 130357.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130357>
- Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Galafassi, S., Volta, P., Bettinetti, R., 2020. Microplastic contamination in freshwater environments: A review, focusing on interactions with sediments and benthic organisms. *Environ. - MDPI* 7, 1–27.
<https://doi.org/10.3390/environments7040030>
- Bernier, S.P., Surette, M.G., 2013. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front. Microbiol.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>
- Besag, J., Clifford, P., 1989. Generalized Monte Carlo significance tests. *Biometrika* 76, 633–642.
- Bessa, F., Barría, P., Neto, J.M., Frias, J.P.G.L., Otero, V., Sobral, P., Marques, J.C., 2018. Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 128, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.044>
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P., Ke, P.C., 2010. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *J. Phys. Chem. C* 114, 16556–16561.
<https://doi.org/10.1021/jp1054759>
- Birklett, J.W., 2003. Scope of the problem. In *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Blair, R.M., Waldron, S., Phoenix, V., Gauchotte-Lindsay, C., 2017. Micro- and Nanoplastic Pollution of Freshwater and Wastewater Treatment Systems. *Springer Sci. Rev.* 5, 19–30.
<https://doi.org/10.1007/s40362-017-0044-7>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S.,

- Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A. V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonino, M., Schellino, R., Rizzi, C., Aigotti, R., Delfini, C., Baiocchi, C., 2003. Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chem.* 80, 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00340-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00340-0)
- Boots, M., Begon, M., 1993. Trade-offs with resistance to a granulosis virus in the indian meal moth, examined by a laboratory evolution experiment. *Funct. Ecol.* 7, 528–534.
- Borneman, J., Triplett, E.W., 1997. Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1621–1624. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00084-9)
- Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M., 2015. Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 3–18. https://doi.org/10.1007/10_2014_285.
- Bougeard, S., Dray, S., 2018. Supervised Multiblock Analysis in R with the ade4 Package. *J. Stat. Softw.* 86, 1–17.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>

- Brockman, S.A., Roden, E. V., Hegeman, A.D., 2018. Van Krevelen diagram visualization of high resolution-mass spectrometry metabolomics data with OpenVanKrevelen. *Metabolomics* 14, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1343-y>
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00066-3)
- Browne, N., Surlis, C., Kavanagh, K., 2014. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.* 63, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.006>
- Bundschuh, M., Hahn, T., Ehrlich, B., Hölte, S., Kreuzig, R., Schulz, R., 2016. Acute Toxicity and Environmental Risks of Five Veterinary Pharmaceuticals for Aquatic Macroinvertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 139–143. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1656-8>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Capozzi, F., Carotenuto, R., Giordano, S., Spagnuolo, V., 2018. Evidence on the effectiveness of mosses for biomonitoring of microplastics in fresh water environment. *Chemosphere* 205, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.074>
- Carles, L., Gardon, H., Joseph, L., Sanchís, J., Farré, M., Artigas, J., 2019. Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. *Environ. Int.* 124, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.064>
- Carstens, K.L., Gross, A.D., Moorman, T.B., Coats, J.R., 2013. Sorption and photodegradation processes govern distribution and fate of sulfamethazine in freshwater-sediment

- microcosms. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10877–10883. <https://doi.org/10.1021/es402100g>
- Cavallaro, M.C., Main, A.R., Liber, K., Phillips, I.D., Headley, J. V., Peru, K.M., Morrissey, C.A., 2019. Neonicotinoids and other agricultural stressors collectively modify aquatic insect communities. *Chemosphere* 226, 945–955.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.176>
- Cetinić, K.A., Previšić, A., Rožman, M., 2021. Holo- and hemimetabolism of aquatic insects: Implications for a differential cross-ecosystem flux of metals. *Environ. Pollut.* 277.
- Chen, D., Shao, M., Sun, S., Liu, T., Zhang, H., Qin, N., Zeng, R., Song, Y., 2019. Enhancement of jasmonate-mediated antiherbivore defense responses in tomato by acetic acid, a potent inducer for plant protection. *Front. Plant Sci.* 10, 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00764>
- Chen, J., Yu, Z., Michel, F.C., Wittum, T., Morrison, M., 2007. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>
- Chen, Z., Madden, R.D., Dillwith, J.W., 2005. Effect of precocene II on fatty acid metabolism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, under cold stress. *J. Insect Physiol.* 51, 411–416.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.02.006>
- Clarke, K.R., Gorley, R.N., 2015. User manual v7.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Galloway, T.S., 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci. Rep.* 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep04528>
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wiegand, C., 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 105, 428–437.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>
- Coppola, A.I., Wiedemeier, D.B., Galy, V., Haghipour, N., Hanke, U.M., Nascimento, G.S., Usman, M., Blattmann, T.M., Reisser, M., Freymond, C. V., Zhao, M., Voss, B., Wacker,

- L., Schefuß, E., Peucker-Ehrenbrink, B., Abiven, S., Schmidt, M.W.I., Eglinton, T.I., 2018. Global-scale evidence for the refractory nature of riverine black carbon. *Nat. Geosci.* 11, 584–588. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0159-8>
- Corcoll, N., Casellas, M., Huerta, B., Guasch, H., Acuña, V., Rodríguez-Mozaz, S., Serra-Compte, A., Barceló, D., Sabater, S., 2015. Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. *Sci. Total Environ.* 503–504, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.093>
- Corp, I., 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0.
- Costa, M.S., Rego, A., Ramos, V., Afonso, T.B., Freitas, S., Preto, M., Lopes, V., Vasconcelos, V., Magalhães, C., Leaõ, P.N., 2016. The conifer biomarkers dehydroabietic and abietic acids are widespread in Cyanobacteria. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23436>
- Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Garya, S.F., Narayanaswamy, B.E., 2017. Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Anal. Methods* 1437–1445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C6AY02343F>
- Cox, M.M., 2015. *Molecular Biology: Principles and Practice*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Cueva-Mestanza, R., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padrón, M.E., Santana-Rodríguez, J.J., 2008. Preconcentration of pharmaceuticals residues in sediment samples using microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase extraction and their determination by HPLC-UV. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 863, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.026>
- Dawson, A.L., Motti, C.A., Kroon, F.J., 2020. Solving a Sticky Situation: Microplastic Analysis of Lipid-Rich Tissue. *Front. Environ. Sci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.563565>
- De Carvalho, C.C.C.R., Caramujo, M.J., 2018. The various roles of fatty acids. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- Dehaut, A., Cassone, A.L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G.,

- Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* 215, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>
- Della Greca, M., Pinto, G., Pistillo, P., Pollio, A., Previtera, L., Temussi, F., 2008. Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere* 70, 2047–2053. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.011>
- Dempster, T.A., Sommerfeld, M.R., 1998. Effects of environmental conditions on growth and lipid accumulation in *Nitzschia communis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 34, 712–721.
- Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, R.M., Zou, H., Zhu, W., 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Pollut.* 238, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.001>
- Dussault, É.B., Balakrishnan, V.K., Sverko, E., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2008. Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 425–432. <https://doi.org/10.1897/07-354R.1>
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R.C., Aldridge, D.C., 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Res.* 75, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.012>
- Ehlers, S.M., Al Najjar, T., Taupp, T., Koop, J.H.E., 2020. PVC and PET microplastics in caddisfly (*Lepidostoma basale*) cases reduce case stability. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 22380–22389. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08790-5>
- Ehlers, S.M., Manz, W., Koop, J.H.E., 2019. Microplastics of different characteristics are incorporated into the larval cases of the freshwater caddisfly *Lepidostoma basale*. *Aquat. Biol.* 28, 67–77. <https://doi.org/10.3354/ab00711>
- Elbrecht, V., Beermann, A.J., Goessler, G., Neumann, J., Tollrian, R., Wagner, R., Wlecklik, A., Piggott, J.J., Matthaei, C.D., Leese, F., 2016. Multiple-stressor effects on stream invertebrates: A mesocosm experiment manipulating nutrients, fine sediment and flow

- velocity. *Freshw. Biol.* 61, 362–375. <https://doi.org/10.1111/fwb.12713>
- European Commission, 2015. European Commission, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of t. Off. J. Eur. Union L 78 2015, 40–42.
- Fazey, F.M.C., Ryan, P.G., 2016. Biofouling on buoyant marine plastics: An experimental study into the effect of size on surface longevity. *Environ. Pollut.* 210, 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.026>
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Sci. Total Environ.* 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fernandez-Torres, R., Bello Lopez, M.A., Consentino, M.O., Mochón, M.C., 2011. Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples by high-performance liquid chromatography with diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) detection. *Anal. Lett.* 44, 2357–2372. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.551693>
- Fokina, N.N., Ruokolainen, T.R., Nemova, N.N., Bakhmet, I.N., 2013. Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biol. Trace Elem. Res.* 154, 217–225. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9727-3>
- Foley, C.J., Feiner, Z.S., Malinich, T.D., Höök, T.O., 2018. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates, *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.046>
- Fu, Q., Wu, X., Ye, Q., Ernst, F., Gan, J., 2016. Biosolids inhibit bioavailability and plant uptake of triclosan and triclocarban. *Water Res.* 102, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.026>
- Fu, Q., Ye, Q., Zhang, J., Richards, J., Borchardt, D., Gan, J., 2017. Diclofenac in *Arabidopsis*

- cells: Rapid formation of conjugates. *Environ. Pollut.* 222, 383–392.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.022>
- Gallitelli, L., Cera, A., Cesarini, G., Pietrelli, L., Scalici, M., 2021. Preliminary indoor evidences of microplastic effects on freshwater benthic macroinvertebrates. *Sci. Rep.* 11, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80606-5>
- Gebert, F., Obrist, M.K., Siber, R., Altermatt, F., Bollmann, K., Schuwirth, N., 2022. Recent trends in stream macroinvertebrates: warm-adapted and pesticide-tolerant taxa increase in richness. *Biol. Lett.* 18, 20210513.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Gionchetta, Giulia, Artigas, J., Arias-Real, R., Oliva, F., Romaní, A.M., 2020. Multi-model assessment of hydrological and environmental impacts on streambed microbes in Mediterranean catchments. *Environ. Microbiol.* 22, 2213–2229.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14990>
- Gionchetta, G., Oliva, F., Romaní, A.M., Bañeras, L., 2020. Hydrological variations shape diversity and functional responses of streambed microbes. *Sci. Total Environ.* 714, 136838.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136838>
- Giovanni, P., de Biase, A., Deeva, I.B., Degan, P., Doronin, Y.K., Iaccarino, M., Oral, R., Trieff, N.M., Warnau, M., Korkina, L.G., 2001. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci.* 68, 1735–1749.
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Tushara Chaminda, G.G., An, A.K., Kumar, M., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundw. Sustain. Dev.* 6, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- Goldring, J.P.D., 2019. Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis, in: Scofiel, B.T.K. and R.H. (Ed.), *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer Nature 2019, pp. 31–39.

- Gómez-Canela, C., Miller, T.H., Bury, N.R., Tauler, R., Barron, L.P., 2016. Targeted metabolomics of *Gammarus pulex* following controlled exposures to selected pharmaceuticals in water. *Sci. Total Environ.* 562, 777–788.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.181>
- González-Tokman, D., Córdoba-Aguilar, A., Dáttilo, W., Lira-Noriega, A., Sánchez-Guillén, R.A., Villalobos, F., 2020. Insect responses to heat: physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biol. Rev.* 95, 802–821.
<https://doi.org/10.1111/brev.12588>
- Gopal, V., Parvathy, S., Balasubramanian, P.R., 1997. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a big-indicator of pollution stress. *Environ. Monit. Assess.* 48, 117–124. <https://doi.org/10.1023/A:1005767517819>
- Grabicova, K., Vojs Staňová, A., Koba Učun, O., Borik, A., Randak, T., Grabic, R., 2018. Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples. *Anal. Chim. Acta* 1022, 53–60.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.011>
- Green, D.S., Colgan, T.J., Thompson, R.C., Carolan, J.C., 2019. Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Environ. Pollut.* 246, 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.017>
- Grgić, I., Vilenica, M., Brigić, A., Dorić, V., Mihaljević, Z., Previšić, A., 2022. Seasonal and spatial dynamics of the aquatic insect communities of an intermittent Mediterranean river. *Limnologica* 96, 125953. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2022.125953>
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. *J. Chromatogr. A* 1248, 104–121.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.084>
- Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Cocconcelli, P.S., 2001. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus*

- helveticus. *Microbiology* 147, 2255–2264. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2255>
- Han, X., Zheng, Y., Dai, C., Duan, H., Gao, M., Ali, M.R., Sui, L., 2021. Effect of polystyrene microplastics and temperature on growth, intestinal histology and immune responses of brine shrimp *Artemia franciscana*. *J. Oceanol. Limnol.* 39, 979–988. <https://doi.org/10.1007/s00343-020-0118-2>
- He, M., Ding, N.Z., 2020. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Front. Plant Sci.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.562785>
- Heye, K., Graumnitz, S., Rybicki, M., Schür, C., Völker, J., Wick, A., Oehlmann, J., Jungmann, D., Oetken, M., 2019a. Laboratory-to-field extrapolation: Increase in carbamazepine toxicity in a higher tier, multiple-stress experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 183, 109481. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109481>
- Heye, K., Lotz, T., Wick, A., Oehlmann, J., 2019b. Interactive effects of biotic and abiotic environmental stressors on carbamazepine toxicity in the non-biting midge *Chironomus riparius*. *Water Res.* 156, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.007>
- Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K., Law, L.K., Lit, L.C.W., Ng, K.F., Suen, M.W.M., Tai, H.L., 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem. Rev.* 24, 3–12.
- Hockaday, W.C., Grannas, A.M., Kim, S., Hatcher, P.G., 2006. Direct molecular evidence for the degradation and mobility of black carbon in soils from ultrahigh-resolution mass spectral analysis of dissolved organic matter from a fire-impacted forest soil. *Org. Geochem.* 37, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2005.11.003>
- Holt, M.S., 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem. Toxicol.* 38. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00136-2)
- Huang, W., Song, B., Liang, J., Niu, Q., Zeng, G., Shen, M., Deng, J., Luo, Y., Wen, X., Zhang, Y., 2021. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health, *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124187>
- Huerta, B., Jakimska, A., Llorca, M., Ruhí, A., Margoutidis, G., Acuña, V., Sabater, S.,

- Rodriguez-Mozaz, S., Barcelò, D., 2015. Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. *Talanta* 132, 373–381.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.017>
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Nannou, C., Nakis, L., Ruhí, A., Acuña, V., Sabater, S., Barcelo, D., 2016. Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Sci. Total Environ.* 540, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.049>
- Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., Kržan, A., 2016. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 219, 201–209.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.037>
- Jeong, C.B., Won, E.J., Kang, H.M., Lee, M.C., Hwang, D.S., Hwang, U.K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.J., Lee, J.S., 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50, 8849–8857. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01441>
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., Van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G., 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ. Health Perspect.* 114, 32–39. <https://doi.org/10.1289/ehp.8050>
- Kaiser, D., Kowalski, N., Waniek, J.J., 2017. Effects of biofouling on the sinking behavior of microplastics. *Environ. Res. Lett.* 12. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8e8b>
- Katajamaa, M., Miettinen, J., Orešič, M., 2006. MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22, 634–636. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039>
- Kattwinkel, M., Jan-Valentin, K., Foit, K., Liess, M., 2011. Climate change, agricultural insecticide exposure, and risk for freshwater communities. *Ecol. Appl.* 21, 2068–2081.
<https://doi.org/10.1890/10-1993.1>
- Koba, O., Grabicova, K., Cervený, D., Turek, J., Kolarova, J., Randak, T., Zlabek, V., Grabic,

- R., 2018. Transport of pharmaceuticals and their metabolites between water and sediments as a further potential exposure for aquatic organisms. *J. Hazard. Mater.* 342, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.039>
- Kol, S., Elena Merlo, M., Scheltema, R.A., De Vries, M., Vonk, R.J., Kikkert, N.A., Dijkhuizen, L., Breitling, R., Takano, E., 2010. Metabolomic characterization of the salt stress response in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2574–2581. <https://doi.org/10.1128/AEM.01992-09>
- Koutnik, V.S., Leonard, J., Alkidim, S., DePrima, F.J., Ravi, S., Hoek, E.M.V., Mohanty, S.K., 2021. Distribution of microplastics in soil and freshwater environments: Global analysis and framework for transport modeling. *Environ. Pollut.* 274, 116552. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116552>
- Kowalski, N., Reichardt, A.M., Waniek, J.J., 2016. Sinking rates of microplastics and potential implications of their alteration by physical, biological, and chemical factors. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.064>
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120.
- Kratina, P., Watts, T.J., Green, D.S., Kordas, R.L., O’Gorman, E.J., 2019. Interactive effects of warming and microplastics on metabolism but not feeding rates of a key freshwater detritivore. *Environ. Pollut.* 255, 113259. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113259>
- Krause, S., Baranov, V., Nel, H.A., Drummond, J.D., Kukkola, A., Hoellein, T., Sambrook Smith, G.H., Lewandowski, J., Bonnet, B., Packman, A.I., Sadler, J., Inshyna, V., Allen, S., Allen, D., Simon, L., Mermillod-Blondin, F., Lynch, I., 2021. Gathering at the top? Environmental controls of microplastic uptake and biomagnification in freshwater food webs. *Environ. Pollut.* 268, 115750. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115750>
- Kukkola, A., Krause, S., Lynch, I., Sambrook Smith, G.H., Nel, H., 2021. Nano and microplastic interactions with freshwater biota – Current knowledge, challenges and future solutions. *Environ. Int.* 152, 106504. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106504>

- Laville, N., Aït-Ässa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.002>
- Leiser, R., Wu, G.M., Neu, T.R., Wendt-Potthoff, K., 2020. Biofouling, metal sorption and aggregation are related to sinking of microplastics in a stratified reservoir. *Water Res.* 176, 115748. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115748>
- Lenth, R. V., 2016. Least-squares means: The R package lsmeans. *J. Stat. Softw.* 69. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>
- Li, J., Liu, H., Paul Chen, J., 2018. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Res.* 137, 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056>
- Lindsey, E., Altizer, S., 2009. Sex differences in immune defenses and response to parasitism in monarch butterflies. *Evol. Ecol.* 23, 607–620. <https://doi.org/10.1007/s10682-008-9258-0>
- Lu, T., Zhu, Y., Ke, M., Peijnenburg, W.J.G.M., Zhang, M., Wang, T., Chen, J., Qian, H., 2019. Evaluation of the taxonomic and functional variation of freshwater plankton communities induced by trace amounts of the antibiotic ciprofloxacin. *Environ. Int.* 126, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.050>
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S., 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00224-4)
- Martyniuk, V., Gylytė, B., Matskiv, T., Khoma, V., Tulaidan, H., Gnatyshyna, L., Orlova-Hudim, K., Manusadžianas, L., Oksana, S., 2022. Stress responses of bivalve mollusc *Unio tumidus* from two areas to ibuprofen, microplastic and their mixture. *Ecotoxicology* 31, 1369–1381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10646-022-02594-8>
- Mateos-Cárdenas, A., Moroney, A. V., Van Pelt, F.N., O'Halloran, J., Jansen, M.A., 2022. Trophic transfer of microplastics in a model freshwater microcosm; lack of a consumer

- avoidance response. *Food Webs* 31.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2022.e00228>
- Mateos-Cárdenas, A., O'Halloran, J., van Pelt, F.N.A.M., Jansen, M.A.K., 2020. Rapid fragmentation of microplastics by the freshwater amphipod *Gammarus duebeni* (Lillj.). *Sci. Rep.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69635-2>
- Mateos-Cárdenas, A., Scott, D.T., Seitmaganbetova, G., van, van P., John, O.H., Marcel A.K., J., 2019. Polyethylene microplastics adhere to *Lemna minor* (L.), yet have no effects on plant growth or feeding by *Gammarus duebeni* (Lillj.). *Sci. Total Environ.* 689, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.359>
- Match, E.K., Chavez Soria, N.G., Aga, D.S., Atilla-Gokcumen, G.E., 2019. Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants. *J. Hazard. Mater.* 373, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.084>
- McKean, K.A., Nunney, L., 2005. Bateman's principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evolution* (N. Y.) 59, 1510. <https://doi.org/10.1554/04-657>
- McKew, B.A., Taylor, J.D., McGenity, T.J., Underwood, G.J.C., 2011. Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *ISME J.* 5, 30–41. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.91>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217.
- Meadows, J.A., Wargo, M.J., 2015. Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiol. (United Kingdom)* 161, 1161–1174. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000080>
- Miao, L., Gao, Y., Adyel, T.M., Huo, Z., Liu, Z., Wu, J., Hou, J., 2021. Effects of biofilm colonization on the sinking of microplastics in three freshwater environments. *J. Hazard. Mater.* 413, 125370. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125370>
- Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A.M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J.M., García-Casado, G., Gouhier-Darimont, C., Reymond, P., Takahashi, K., García-Mina, J.M., Nishihama, R., Kohchi, T., Solano, R., 2018. Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway

- in land plants. *Nat. Chem. Biol.* 14, 480–488. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0033-4>
- Monteiro, S.S., Pinto da Costa, J., 2022. Methods for the extraction of microplastics in complex solid, water and biota samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 33, e00151.
- Moser, T., Römbke, J., Schallnass, H.-J., Van Gestel, C.A.M., 2007. The use of the multivariate Principal Response Curve (PRC) for community level analysis : a case study on the effects of carbendazim on enchytraeids in Terrestrial Model Ecosystems (TME) 573–583. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0169-6>
- Muñoz, I., López-Doval, J.C., De Castro-Català, N., Kuzmanovic, M., Ginebreda, A., Sabater, S., 2016. Effects of emerging contaminants on biodiversity, community structure, and adaptation of river biota. *Handb. Environ. Chem.* 46, 79–119. https://doi.org/10.1007/698_2015_5013
- Nakayasu, E., Nicora, C., Sims, A., Burnum-Johnson, K., Kim, Y.-M., Kyle, J., Matzke, M., Shukla, A., Chu, R., AA Schepmoes, Jacobs, J., Baric, R., Webb-Robertson, B.-J., Smith, R., Metz Thomas, O., 2016. MPLEx : a Robust and Universal Protocol. *mSystems* 1, 1–14. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00043-16>.Editor
- Nelms, S.E., Galloway, T.S., Godley, B.J., Jarvis, D.S., Lindeque, P.K., 2018. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environ. Pollut.* 238, 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.016>
- Nguyen, H.T.T., Choi, S., Kim, S., Lee, J.H., Park, A.R., Yu, N.H., Yoon, H., Bae, C.H., Yeo, J.H., Choi, G.J., Son, H., Kim, J.C., 2020. The hsp90 inhibitor, monorden, is a promising lead compound for the development of novel fungicides. *Front. Plant Sci.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00371>
- Okazaki, Y., Saito, K., 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J.* 79, 584–596. <https://doi.org/10.1111/tpj.12556>
- Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., 2022. Vegan: community ecology package. R package version 2.5–7. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (Accessed April 17, 2022).
- Omar, T.F.T., Ahmad, A., Aris, A.Z., Yusoff, F.M., 2016. Endocrine disrupting compounds

- (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 85, 241–259. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.004>
- Overgaard, J., Sørensen, J.G., 2008. Rapid thermal adaptation during field temperature variations in *Drosophila melanogaster*. *Cryobiology* 56, 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.01.001>
- Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Delerue-Matos, C., 2017. Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.013>
- Pallarés, S., Botella-Cruz, M., Arribas, P., Millán, A., Velasco, J., 2017. Aquatic insects in a multistress environment: Cross-tolerance to salinity and desiccation. *J. Exp. Biol.* 220, 1277–1286. <https://doi.org/10.1242/jeb.152108>
- Pang, J.M., Layre, E., Sweet, L., Sherrid, A., Moody, D.B., Ojha, A., Sherman, D.R., 2012. The polyketide *pkS1* contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 194, 715–721. <https://doi.org/10.1128/JB.06304-11>
- Past, P.G., 1971. Insect lipids. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* 11. [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(71\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0079-6832(71)90006-1)
- Pecl, G.T., Araújo, M.B., Bell, J.D., Blanchard, J., Bonebrake, T.C., Chen, I.C., Clark, T.D., Colwell, R.K., Danielsen, F., Evengård, B., Falconi, L., Ferrier, S., Frusher, S., Garcia, R.A., Griffis, R.B., Hobday, A.J., Janion-Scheepers, C., Jarzyna, M.A., Jennings, S., Lenoir, J., Linnetved, H.I., Martin, V.Y., McCormack, P.C., McDonald, J., Mitchell, N.J., Mustonen, T., Pandolfi, J.M., Pettorelli, N., Popova, E., Robinson, S.A., Scheffers, B.R., Shaw, J.D., Sorte, C.J.B., Strugnell, J.M., Sunday, J.M., Tuanmu, M.N., Vergés, A., Villanueva, C., Wernberg, T., Wapstra, E., Williams, S.E., 2017. Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. *Science* (80-.). 355. <https://doi.org/10.1126/science.aai9214>
- Pei, R., Kim, S.C., Carlson, K.H., Pruden, A., 2006. Effect of River Landscape on the sediment

- concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.* 40, 2427–2435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2014. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22, 685–696. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)
- Pinu, F.R., Beale, D.J., Paten, A.M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H.J., Wishart, D., 2019. Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. *Metabolites* 9, 1–31. <https://doi.org/10.3390/metabo9040076>
- Pittura, L., Avio, C.G., Giuliani, M.E., d’Errico, G., Keiter, S.H., Cormier, B., Gorbi, S., Regoli, F., 2018. Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: Combined chemical and physical hazards to the mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Front. Mar. Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00103>
- Pop, C., Mogosan, C., Loghin, F., 2014. Evaluation of rapigest efficacy for the digestion of proteins from cell cultures and heart tissue. *Clujul Med.* 87, 5. <https://doi.org/10.15386/cjmed-367>
- Previšić, A., Rožman, M., Mor, J.R., Acuña, V., Serra-Compte, A., Petrović, M., Sabater, S., 2020. Aquatic macroinvertebrates under stress: Bioaccumulation of emerging contaminants and metabolomics implications. *Sci. Total Environ.* 704, 135333. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135333>
- Previšić, A., Vilenica, M., Vučković, N., Petrović, M., Rožman, M., 2021a. Aquatic Insects Transfer Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors from Aquatic to Terrestrial Ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 55, 3736–3746. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07609>
- Previšić, A., Vilenica, M., Vučković, N., Petrović, M., Rožman, M., 2021b. Aquatic insects transfer pharmaceuticals and endocrine disruptors from aquatic to terrestrial ecosystems.

- Environ. Sci. Technol. 55, 3736–3746. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07609>
- Proia, L., Osorio, V., Soley, S., Köck-Schulmeyer, M., Pérez, S., Barceló, D., Romaní, A.M., Sabater, S., 2013. Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river. *Environ. Pollut.* 178, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.022>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rahman, M.F., Yanful, E.K., Jasim, S.Y., 2009. Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: Implications for the drinking water industry and global environmental health. *J. Water Health* 7, 224–243. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.021>
- Razanajatovo, R.M., Ding, J., Zhang, S., Jiang, H., Zou, H., 2018. Sorption and desorption of selected pharmaceuticals by polyethylene microplastics. *Mar. Pollut. Bull.* 136, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.048>
- Redondo-Hasselerharm, P.E., Falahudin, D., Peeters, E.T.H.M., Koelmans, A.A., 2018. Microplastic effect thresholds for freshwater benthic macroinvertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2278–2286. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05367>
- Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Bonnineau, C., Geiszingerb, A., Farré, M. la, Ferrer, J., Ricciardi, F., Romaní, A.M., Morin, S., Proia, L., Sala, L., Sureda, D., Sabater, S., 2010. Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential: Toxic effects on river biofilms. *Aquat. Toxicol.* 100, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.010>
- Riemenschneider, C., Seiwert, B., Goldstein, M., Al-Raggad, M., Salameh, E., Chefetz, B., Reemtsma, T., 2017. An LC-MS/MS method for the determination of 28 polar environmental contaminants and metabolites in vegetables irrigated with treated municipal wastewater. *Anal. Methods* 9, 1273–1281. <https://doi.org/10.1039/c6ay02984a>

- Roblin, B., Aherne, J., 2020. Moss as a biomonitor for the atmospheric deposition of anthropogenic microfibres. *Sci. Total Environ.* 715, 136973. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136973>
- Rocchetta, I., Mazzuca, M., Conforti, V., Ruiz, L., Balzaretto, V., De Molina, M.D.C.R., 2006. Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environ. Pollut.* 141, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.035>
- Romero, F., Acuña, V., Sabater, S., 2020. Multiple stressors determine community structure and estimated function of river biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 86. <https://doi.org/10.1128/AEM.00291-20>
- Romero, F., Sabater, S., Timoner, X., Acuña, V., 2018. Multistressor effects on river biofilms under global change conditions. *Sci. Total Environ.* 627, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.161>
- Rosi-Marshall, E.J., Kincaid, D.W., Bechtold, H.A., Royer, T. V., Rojas, M., Kelly, J.J., 2013. Pharmaceuticals suppress algal growth and microbial respiration and alter bacterial communities in stream biofilms. *Ecol. Appl.* 23, 583–593. <https://doi.org/10.1890/12-0491.1>
- Rosselló-Mora, R., Lucio, M., Pêa, A., Brito-Echeverría, J., López-López, A., Valens-Vadell, M., Frommberger, M., Antón, J., Schmitt-Kopplin, P., 2008. Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME J.* 2, 242–253. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.93>
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *J. Immunol.* 179, 7209–7214. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7209>
- Rozman, U., Jemec Kokalj, A., Dolar, A., Drobne, D., Kalčíková, G., 2022. Long-term interactions between microplastics and floating macrophyte *Lemna minor*: The potential for phytoremediation of microplastics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 831, 154866. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154866>
- Rozman, U., Kalčíková, G., 2022. The Response of Duckweed *Lemna minor* to Microplastics and Its Potential Use as a Bioindicator of Microplastic Pollution. *Plants* 11, 2953.

<https://doi.org/10.3390/plants11212953>

- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., Schmitt-Jansen, M., 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. the biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1425–1434. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1051-8>
- Salem, M.A., Jüppner, J., Bajdzienko, K., Giavalisco, P., 2016. Protocol: A fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. *Plant Methods* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0146-2>
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfrey, N., Porcher, J.M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ. Int.* 37, 1342–1348. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.002>
- Santos, L., Ramos, F., 2016. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 52, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.015>
- Sauvé, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Mar. Pollut. Bull.* 8, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.035>
- Scherer, C., Weber, A., Stock, F., Vurusic, S., Egerci, H., Kochleus, C., Arendt, N., Foeldi, C., Dierkes, G., Wagner, M., Brennholt, N., Reifferscheid, G., 2020. Comparative assessment of microplastics in water and sediment of a large European river. *Sci. Total Environ.* 738, 139866. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139866>
- Schmid-Hempel, P., Ebert, D., 2003. On the evolutionary ecology of species' ranges. *Evol. Ecol. Res.* 5, 159–178.
- Schulte, P.M., 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J. Exp. Biol.* 217, 23–34. <https://doi.org/10.1242/jeb.089722>
- Seddiqui, Z.S., Ahmed, S., 2006. Combined effects of pesticide on growth and nutritive composition of soybean plants. *Pakistan J. Bot.* 38, 721–733.

- Segner, H., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2014. Assessing the Impact of Multiple Stressors on Aquatic Biota: The Receptor's Side Matters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7690–7696. <https://doi.org/10.1021/es405082t>
- Semcesen, P.O., Wells, M.G., 2021. Biofilm growth on buoyant microplastics leads to changes in settling rates: Implications for microplastic retention in the Great Lakes. *Mar. Pollut. Bull.* 170, 112573. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112573>
- Serra-Compte, A., Corcoll, N., Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, S., Barceló, D., Álvarez-Muñoz, D., 2018a. Fluvial biofilms exposed to desiccation and pharmaceutical pollution: New insights using metabolomics. *Sci. Total Environ.* 618, 1382–1388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.258>
- Serra-Compte, A., Maulvault, A.L., Camacho, C., Álvarez-Muñoz, D., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Marques, A., 2018b. Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolization and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environ. Pollut.* 236, 824–834. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.018>
- Serra, T., Barcelona, A., Pous, N., Salvadó, V., Colomer, J., 2020. Synergistic effects of water temperature, microplastics and ammonium as second and third order stressors on *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115439>
- Shabab, M., Khan, S.A., Vogel, H., Heckel, D.G., Boland, W., 2014. OPDA isomerase GST16 is involved in phytohormone detoxification and insect development. *FEBS J.* 281, 2769–2783. <https://doi.org/10.1111/febs.12819>
- Shaliutina-Kolešová, A., Shaliutina, O., Nian, R., 2020. The effects of environmental antidepressants on macroinvertebrates: a mini review. *Water Environ. J.* 34, 153–159. <https://doi.org/10.1111/wej.12448>
- Shen, Y., Gong, Y.J., Gu, J., Huang, L.H., Feng, Q.L., 2014. Physiological effect of mild thermal stress and its induction of gene expression in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.* 61, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.12.007>
- Sighicelli, M., Pietrelli, L., Lecce, F., Iannilli, V., Falconieri, M., Coscia, L., Di Vito, S., Nuglio,

- S., Zampetti, G., 2018. Microplastic pollution in the surface waters of Italian Subalpine Lakes. *Environ. Pollut.* 236, 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.008>
- Silva, C.J.M., Beleza, S., Campos, D., Soares, A.M.V.M., Patrício Silva, A.L., Pestana, J.L.T., Gravato, C., 2021. Immune response triggered by the ingestion of polyethylene microplastics in the dipteran larvae *Chironomus riparius*. *J. Hazard. Mater.* 414. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125401>
- Silva, C.J.M., Machado, A.L., Campos, D., M.V.M. Soares, A., Pestana, J.L.T., 2022. Combined effects of polyethylene microplastics and natural stressors on *Chironomus riparius* life-history traits. *Environ. Res.* 213. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113641>
- Silva, C.O., Simões, T., Novais, S.C., Pimparel, I., Granada, L., Soares, A.M.V.M., Barata, C., Lemos, M.F.L., 2017. Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. *Sci. Total Environ.* 586, 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.015>
- Slos, S., de Meester, L., Stoks, R., 2009. Food level and sex shape predator-induced physiological stress: Immune defence and antioxidant defence. *Oecologia* 161, 461–467. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1401-2>
- Smith, N.W., Shorten, P.R., Altermann, E., Roy, N.C., McNabb, W.C., 2019. The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding. *Front. Ecol. Evol.* 7, 1–15.
- Smykal, V., Daimon, T., Kayukawa, T., Takaki, K., Shinoda, T., Jindra, M., 2014. Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. *Dev. Biol.* 390, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.03.006>
- Song, J., Jongmans-Hochschulz, E., Mauder, N., Imirzalioglu, C., Wichels, A., Gerdt, G., 2020. The Travelling Particles: Investigating microplastics as possible transport vectors for multidrug resistant *E. coli* in the Weser estuary (Germany). *Sci. Total Environ.* 720, 137603. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137603>
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8, 768–777. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189>

- Stillwell, R.C., Davidowitz, G., 2010. Sex differences in phenotypic plasticity of a mechanism that controls body size: Implications for sexual size dimorphism. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 3819–3826. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0895>
- Straub, S., Hirsch, P.E., Burkhardt-Holm, P., 2017. Biodegradable and petroleum-based microplastics do not differ in their ingestion and excretion but in their biological effects in a freshwater invertebrate *Gammarus fossarum*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070774>
- Subirats, J., Timoner, X., Sànchez-Melsió, A., Balcázar, J.L., Acuña, V., Sabater, S., Borrego, C.M., 2018. Emerging contaminants and nutrients synergistically affect the spread of class 1 integron-integrase (*intI1*) and *sul1* genes within stable streambed bacterial communities. *Water Res.* 138, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.025>
- Sun, Y., Zhao, J., Xiao, Y.-F., Zhang, Y.-J., Bai, L.-X., 2016. Identification of heat shock cognate protein 70 gene (*Alhsc70*) of *Apolygus lucorum* and its expression in response to different temperature and pesticide stresses. *Insect Sci.* 23, 1–34. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12193>.This
- Szklarczyk, D., Santos, A., Von Mering, C., Jensen, L.J., Bork, P., Kuhn, M., 2016. STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Res.* 44, D380–D384. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1277>
- Tagliaferro, M., Rocha, C., Marques, J.C., Gonçalves, A.M.M., 2022. Assessment of metal exposure (uranium and copper) in fatty acids and carbohydrate profiles of *Calamoceras marsupus* larvae (Trichoptera) and *Alnus glutinosa* leaf litter. *Sci. Total Environ.* 836.
- Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7759–7764. <https://doi.org/10.1021/es071737s>
- Tewari, A., Paroha, P.P., 2021. Emerging Contaminants: Challenge For Ground And Surface Water Management. *Indian J. Environ. Prot.* 41, 1391–1398.
- Tholl, D., 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.014>

- Thorp, J.H., Rogers, D.C., 2011. Field guide to freshwater invertebrates of North America.
- Tibbetts, J., Krause, S., Lynch, I., Sambrook Smith, G., 2018. Abundance, distribution, and drivers of microplastic contamination in urban river environments. *Water* 10 (11).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w10111597>
- Timoner, X., Borrego, C.M., Acuña, V., Sabater, S., 2014. The dynamics of biofilm bacterial communities is driven by flow wax and wane in a temporary stream. *Limnol. Oceanogr.* 59, 2057–2067. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.6.2057>
- Tojo, S., 1971. Uric acid production in relation to protein metabolism in the silkworm, *Bombyx mori*, during pupal-adult development. *Insect Biochem.* 1, 249–263.
[https://doi.org/10.1016/0020-1790\(71\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0020-1790(71)90041-2)
- Urbanič, G., Mihaljevic, Z., Petkovska, V., Urbanic, M.P., 2020. Disentangling the effects of multiple stressors on large rivers using benthic invertebrates-a study of southeastern european large rivers with implications for management. *Water (Switzerland)* 12, 1–25.
<https://doi.org/10.3390/w12030621>
- Varg, J.E., Bergvall, C., Svanbäck, R., 2022. The Stressful Effects of Microplastics Associated With Chromium (VI) on the Microbiota of *Daphnia Magna*. *Front. Environ. Sci.* 10, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.875512>
- Veach, A.M., Bernot, M.J., 2011. Temporal variation of pharmaceuticals in an urban and agriculturally influenced stream. *Sci. Total Environ.* 409, 4553–4563.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.022>
- Velasco, J., Gutiérrez-Cánovas, C., Botella-Cruz, M., Sánchez-Fernández, D., Arribas, P., Carbonell, J.A., Millán, A., Pallarés, S., 2019. Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0011>
- Veseli, M., Rožman, M., Vilenica, M., Petrović, M., Previšić, A., 2022. Bioaccumulation and bioamplification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in aquatic insects. *Sci. Total Environ.* 838, 156208.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries,

- E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A.D., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0012-7>
- Wang, Z., Qin, Y., Li, W., Yang, W., Meng, Q., Yang, J., 2019. Microplastic contamination in freshwater: first observation in Lake Ulansuhai, Yellow River Basin, China. *Environ. Chem. Lett.* 17, 1821–1830. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00888-8>
- Wheeler, D.E., Nijhout, H.F., 2003. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *BioEssays* 25, 994–1001. <https://doi.org/10.1002/bies.10337>
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Windsor, F.M., Tilley, R.M., Tyler, C.R., Ormerod, S.J., 2019. Microplastic ingestion by riverine macroinvertebrates. *Sci. Total Environ.* 646, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.271>
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., Van der Heide, T., Smith, L.T., 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 130, 437–460. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00442-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00442-1)
- Wrona, F.J., Prowse, T.D., Reist, J.D., Hobbie, J.E., Lévesque, L.M.J., Vincent, W.F., 2006. Climate change effects on aquatic biota, ecosystem structure and function. *Ambio* 35, 359–369. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2006\)35\[359:CCEOAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2006)35[359:CCEOAB]2.0.CO;2)
- Wu, F., Sun, D., Wang, N., Gong, Y., Li, L., 2011. Comparison of surfactant-assisted shotgun methods using acid-labile surfactants and sodium dodecyl sulfate for membrane proteome analysis. *Anal. Chim. Acta* 698, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.039>
- Wu, X., Conkle, J.L., Ernst, F., Gan, J., 2014. Treated wastewater irrigation: Uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11286–11293. <https://doi.org/10.1021/es502868k>

- Wu, X., Conkle, J.L., Gan, J., 2012. Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *J. Chromatogr. A* 1254, 78–86.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.041>
- Yuan, M., Faggio, C., Perugini, M., Aliko, V., Wang, Y., 2023. Editorial: Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals: The physiological consequences of exposure to pollutants in aquatic animals. *Front. Physiol.* 14, 1145052.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1145052>
- Zheng, W., Huyan, J., Tian, Z., Zhang, Y., Wen, X., 2020a. Clinical class 1 integron-integrase gene – A promising indicator to monitor the abundance and elimination of antibiotic resistance genes in an urban wastewater treatment plant. *Environ. Int.* 135, 105372.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105372>
- Zheng, W., Huyan, J., Tian, Z., Zhang, Y., Wen, X., 2020b. Clinical class 1 integron-integrase gene – A promising indicator to monitor the abundance and elimination of antibiotic resistance genes in an urban wastewater treatment plant. *Environ. Int.* 135, 105372.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105372>
- Zhukov, A. V., 2015. Palmitic acid and its role in the structure and functions of plant cell membranes. *Russ. J. Plant Physiol.* 62, 706–713.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715050192>
- Ziarrusta, H., Mijangos, L., Prieto, A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., Olivares, M., 2016. Determination of tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 1205–1216.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9224-y>
- Zielińska, E., Zieliński, D., Jakubczyk, A., Karaś, M., Pankiewicz, U., Flasz, B., Dziewięcka, M., Lewicki, S., 2021. The impact of polystyrene consumption by edible insects *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* on their nutritional value, cytotoxicity, and oxidative stress parameters. *Food Chem.* 345, 128846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128846>
- Zhukov, A., V., 2015. Palmitic acid and its role in the structure and functions of plant cell membranes. *Russ. J. Plant Physiol.* 62, 706–713.

<https://doi.org/10.1134/S1021443715050192>

7. PRILOZI

Tablica P1. Deskriptivna statistika rezultata utjecaja matrice i iskoristivosti metode između Oasis HLB Prime i Oasis HLB kolona. *SD* – standardna devijacija, min – najmanja vrijednost, max – najveća vrijednost, *SE* – standardna pogreška.

SPE kolone	statistika	iskoristivost metode (%)	utjecaj matrice (%)
Oasis HLB Prime	srednja vrijednost	56,67	66,01
	medijan	47,96	81,37
	<i>SD</i>	27,12	25,47
	min	19,99	2,10
	max	122,88	91,86
	<i>SE</i>	5,22	4,90
Oasis HLB	srednja vrijednost	82,81	67,01
	medijan	76,45	69,66
	<i>SD</i>	27,56	14,14
	min	26,26	28,56
	max	136,11	85,65
	<i>SE</i>	5,30	2,72

Tablica P2. Deskriptivna statistika rezultata utjecaja matrice i iskoristivosti metode u tkivima tulara i vretencima (odrasli i ličinke), rakušaca, mahovine i obraštaja. *SD* – standardna devijacija, min – najmanja vrijednost, max – najveća vrijednost, *SE* – standardna pogreška.

tkivo	statistika	iskoristivost metode (%)	utjecaj matrice (%)
tulari - ličinke	srednja vrijednost	56,79	65,21
	medijan	47,77	80,46
	<i>SD</i>	27,42	25,62
	min	19,99	2,1
	max	122,88	91,86
	<i>SE</i>	5,38	5,02
tulari - odrasli	srednja vrijednost	101,4	63,18
	medijan	95,28	68,66
	<i>SD</i>	25,53	18,22
	min	62,01	8,44
	max	168,55	84
	<i>SE</i>	5,01	3,57

Tablica P2. – nastavak.

tkivo	statistika	iskoristivost metode	utjecaj matrice
vretenca - ličinke	srednja vrijednost	140,74	74,68
	medijan	136,32	77,8
	<i>SD</i>	30,93	15
	min	97,18	39,05
	max	203,32	92,82
	<i>SE</i>	6,07	2,94
vretenca - odrasli	srednja vrijednost	120,49	77,37
	medijan	116,46	79,37
	<i>SD</i>	24,99	11,45
	min	70,8	52,9
	max	165,78	92,54
	<i>SE</i>	4,9	2,24
rakušci	srednja vrijednost	113,11	73,85
	medijan	108,28	76,88
	<i>SD</i>	22,96	15,34
	min	64,87	30,15
	max	166,36	94,74
	<i>SE</i>	4,5	3,01
mahovina	srednja vrijednost	65,65	73,14
	medijan	65,5	85,52
	<i>SD</i>	22,49	21,68
	min	14,81	7,92
	max	122,07	95,47
	<i>SE</i>	4,41	4,25
obraštaj	srednja vrijednost	117,37	74,68
	medijan	109,49	77,8
	<i>SD</i>	38,89	15
	min	85,72	39,05
	max	283,7	92,82
	<i>SE</i>	7,63	2,94

Tablica P3. Deskriptivna statistika rezultata iskoristivosti metode izolacije proteina korištenjem različitih surfaktanata. SD – standardna devijacija, min – najmanja vrijednost, max – najveća vrijednost, SE – standardna pogreška.

surfaktant	statistika	iskoristivost metode (%)
SDS	srednja vrijednost	0,97
	medijan	0,97
	<i>SD</i>	0,33
	min	0,49
	max	1,55
	<i>SE</i>	0,09
urea	srednja vrijednost	8,83
	medijan	10,76
	<i>SD</i>	5,84
	min	0,43
	max	17,15
	<i>SE</i>	1,69
RapiGest	srednja vrijednost	17,78
	medijan	22,02
	<i>SD</i>	11,03
	min	0,45
	max	29,94
	<i>SE</i>	3,18

Tablica P4. Broj različitih tipova čestica mikroplastike zabilježenih u uzorcima mahovine i tulara kroz vrijeme trajanja pokusa. Tipovi plastike identificirani su Ramanovom spektroskopijom.

	dani /stadiji	polietilen	polipropilen	polistiren
mahovina	15	13	15	0
	30	9	22	2
	45	4	7	0
	60	13	10	0
tulari	ličinke	3	2	0
	predkukuljice	0	0	0
	kukuljice	0	1	1
	odrasle jedinke	0	1	0

Tablica P5. Metaboliti koji pokazuju najveći odgovor u tularima izloženim tretmanima (mikroplastika, spojevi i kombinacija mikroplastike spojeva) identificirani su usporedbom s postojećim bazama podataka. Odstupanja dobivenih m/z vrijednosti (omjer mase i naboja) izražena je kao pogreška (ppm). RT – vrijeme zadržavanja, NIM – negativni ionski mod, PIM – pozitivni ionski mod.

baza podataka	pogreška (ppm)	RT	mod	MZ masa	naziv metabolita
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	1	15,31	NIM	279,2332	stearolna kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	1	14,58	NIM	254,1225	hipogeična kiselina
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	15	17,08	NIM	282,2559	petroselinska kiselina
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	1	13,41	NIM	252,2089	2-metil-heksadekanska kiselina
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	1	11,83	NIM	249,1863	(7Z,10Z)-heksadekadienska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	2	17,59	NIM	269,249	normbreinolid
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	0	9,66	NIM	209,1184	2-metil-heksadekanska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	1	11,2	NIM	505,2577	(3R,7S)-izo-jasmonska kiselina
metlin, pubchem	1	10,84	NIM	223,1705	miristinska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	1	14,99	NIM	304,2402	5(E)-arahidonska kiselina / 7-metiloktil (Z)-4-decenoat /
genome, pubchem	1	15,28	NIM	279,2017	juvenilni hormon I
metlin, pubchem	1	9,91	NIM	295,2282	12-okso-(9E)-oktadecenska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	1	10,2	NIM	309,2076	15,16-EpODE
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	1	12,76	NIM	276,2089	stearidonska kiselina
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	1	10,21	NIM	291,197	12-OPDA
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	1	9,49	NIM	265,1813	juvenilni hormon III
metlin, pubchem	1	9,63	NIM	275,202	cis-parinarična kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	2	13,99	NIM	278,2246	(10E,12E,14E)-heksadekatrienil acetat
genome, pubchem	2	16,05	NIM	305,2559	(3Z,6Z,9Z)-oktadekatrienil acetat
lipidmaps, metlin, pubchem	1	19,05	NIM	283,2647	heksadecil acetat / neostearinska kiselina
metlin, pubchem	7	18,98	PIM	522,3517	PC(O-16:1(9E)/2:0)[U]
lipidmaps, metlin, pubchem	2	18,94	PIM	377,2692	MG(0:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)
hmdb, metlin, pubchem	7	20,98	PIM	337,2713	3-metil-5-pentil-2-furanundekanska kiselina
metlin, pubchem	7	17,05	PIM	249,1831	4,7,10,13-heksadekatetraenska kiselina
lipidmaps, pubchem	4	18,92	PIM	355,2858	MG(18:2(9Z,12Z)/0:0/0:0)
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	13	18,25	PIM	320,2351	14R,15S-EpETrE

Tablica P5. – nastavak.

baza podataka	pogreška (ppm)	RT	mod	MZ masa	naziv metabolita
lipidmaps, metlin, pubchem	6	16,8	PIM	276,2089	(11E,13E)-oktadekadien-9-inoična kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	2	18,95	PIM	263,2374	9,12,15-oktadekatrienal
hmdb, pubchem	6	16,47	PIM	337,2354	5(S),15(R)-DiHETE
hmdb, metlin, pubchem	7	19,72	PIM	357,2974	MG(18:1(11Z)/0:0/0:0)
hmdb, pubchem	7	18,94	PIM	393,2373	CPA(16:0/0:0)
lipidmaps, metlin, pubchem	7	17,99	PIM	235,2039	10E,12E,14E-heksadekatrienal
genome, pubchem	13	16,82	PIM	317,2069	kafestol
lipidmaps, metlin, pubchem	8	19,25	PIM	237,2194	6,11-heksadekadienal
hmdb, pubchem	7	19,47	PIM	173,0797	trans-3-oktendioinska kiselina
metlin, pubchem	15	15,73	PIM	249,1894	heksadeka-4,7,10,13-tetraenska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	7	16,78	PIM	276,2089	(2E,4E,6E,11Z)-oktadekatetraenska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	14	19,58	PIM	360,3212	N-butil arahidonol amin
lipidmaps, pubchem	4	16,33	PIM	250,1933	6,9,12-heksadekatrienska kiselina
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	7	16,5	PIM	319,2245	15-HEPE
lipidmaps, pubchem	7	18,41	PIM	335,1604	2-brom-heksadekanska kiselina
hmdb, lipidmaps, pubchem	8	19,34	PIM	309,2401	3-metil-5-propil-2-furanundekanska kiselina
lipidmaps, pubchem	7	20,22	PIM	338,3394	erucamid
genome, pubchem	13	19,7	PIM	379,2793	1-arahidonoliglicerol
lipidmaps, pubchem	7	18,96	PIM	279,2299	izorumelenska kiselina

Tablica P6. Metaboliti koji pokazuju najveći odgovor u mahovinama izloženim tretmanima (mikroplastika, spojevi i kombinacija mikroplastike spojeva) identificirani su usporedbom s postojećim bazama podataka. Odstupanja dobivenih m/z vrijednosti (omjer mase i naboja) izražena je kao pogreška (ppm). RT – vrijeme zadržavanja, NIM – negativni ionski mod, PIM – pozitivni ionski mod.

baza podataka	pogreška (ppm)	RT	mod	MZ masa	naziv metabolita
genome, lipidmaps, metlin, pubchem	2	9,64	NIM	315,1972	3-beta-hidroksi-9-beta-pimar-7,15-dien-16,6-beta-olid
lipidmaps, pubchem, kegg	7	9,2	NIM	291,1945	6-hidroksioktadeka-7,9-diinska kiselina
lipidmaps, pubchem	2	14,47	NIM	253,2104	(8Z)-heksadecenska kiselina
genome, lipidmaps, pubchem	2	9,2	NIM	291,1945	13-keto-(9Z),(11E),(15Z)-oktadekatrienska kiselina
lipidmaps, pubchem	8	9,85	NIM	293,2128	13R-HODE
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	2	10,57	NIM	296,2351	oktil fenilacetat
lipidmaps, metlin, pubchem	2	10,98	NIM	247,1708	(11E)-heksadecenil acetate
lipidmaps, metlin, pubchem	2	17,09	NIM	281,2491	kladijelin
hmdb, metlin, pubchem	2	14,97	NIM	303,2252	mangiferinska kiselina

Tablica P6. – nastavak.

baza podataka	pogreška (ppm)	RT	mod	MZ masa	naziv metabolita
lipidmaps, metlin, pubchem	1	15,23	NIM	279,2334	krizin
genome, hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	1	5,83	NIM	385,0933	2,4,6-oktatirienal
genome, hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	2	10,26	NIM	121,0657	(9Z)-(13S)-12,13-Epoksio ktadeka-9,11-dienoična kiselina
genome, hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	2	9,85	NIM	293,2128	pisiferna kiselina
metlin, pubchem	1	9,64	NIM	315,1972	9,12-heksadekadienska kiselina
metlin, pubchem	7	17,14	NIM	251,2019	12-okso-(5Z),(8Z),(10E),(14Z)-eikozatetraenska kiselina
pubchem	1	10,34	NIM	317,2101	C16:3
genome, hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	2	18,12	NIM	249,1864	abietska kiselina
hmdb, pubchem	6	13,72	NIM	301,2178	aspidospermin
genome, pubchem	2	8,82	NIM	354,2307	11-hidroksi sugiol
hmdb, metlin, pubchem	2	9,64	NIM	315,1972	hidroksipropionska kiselina
hmdb, metlin, pubchem	3	1,11	PIM	89,0242	feoforbid b
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	15	11,13	PIM	607,2533	15-HEPE
lipidmaps, metlin, pubchem	4	18,09	PIM	319,2219	4,7,10,13-dokozatetraenska kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	5	21,27	PIM	324,2089	8-hidroksi-9,11-oktadekadienska kiselina
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	15	17,57	PIM	292,2038	1-acetoksi-2-hidroksi-16-heptadecen-4-on
lipidmaps, pubchem	8	20,06	PIM	327,2481	izorumelenska kiselina
genome, hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	5	19,37	PIM	279,2296	alfa-metil maslačna kiselina
genome, hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	7	10,82	PIM	103,0748	pimarična kiselina
lipidmaps, metlin, pubchem	1	20,65	PIM	302,2246	N-butil arahidonol amin
metlin, pubchem	8	18,9	PIM	340,2977	cis-parinarična kiselina
hmdb, metlin, pubchem	8	19,46	PIM	277,214	polioksietilen monoricinoleat
hmdb, lipidmaps, metlin, pubchem	14	19,98	PIM	341,2949	persin
lipidmaps, pubchem	7	20,29	PIM	381,2896	erucamid
lipidmaps, metlin, pubchem	1	18,36	PIM	338,3393	cis- i trans inofiloid
hmdb, metlin, pubchem	8	7,61	PIM	403,142	MG(0:0/18:0/0:0)
pubchem	2	18,8	PIM	359,3126	banksialakton E
hmdb, metlin, pubchem	8	19,79	PIM	373,0961	gingeridion
hmdb, metlin, pubchem	14	18,56	PIM	320.1987594	gugulsteron
genome, hmdb, metlin, pubchem	1	17,27	PIM	343,2218	pergolid
hmdb, metlin, pubchem	1	9,2	PIM	315,1887	tovoofilin B
pubchem	2	18,8696	PIM	461,1962	monorden C

Tablica P7. Uvjeti provođenja prepisivanja RNA u cDNA.

cDNA sinteza i preddenaturacija		denaturacija	nalijeganje	produžavanje lanca	posljednje produžavanje lanca
1 ciklus		40 ciklusa			1 ciklus
60 °C	94 °C	94 °C	60 °C	68 °C	68 °C
30 min	5 min	15 s	30 s	1 min	5 min

Tablica P8. Rezultati Studentovog *t*-testa za procjenu razlika u alpha raznolikosti (Chao1 indeks) ukupne mikrobne zajednice (DNA) između različitih tretmana (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). SD – standardna devijacija.

	Chao 1 indeks		grupa 1		grupa 2		statistika	
	groupa 1	groupa 2	srednja vrijednost	SD	srednja vrijednost	SD	<i>t</i>	<i>p</i>
DNA	Kraj-S	Kraj-TO	1551,98	77,59	1639,61	53,66	-1,31	1
	Kraj-T	Kraj-S	1811,10	33,98	1551,98	77,59	4,33	0,39
	Kraj-S	Početak-T	1551,98	77,59	1969,64	63,91	-5,88	0,86
	Početak-S	Kraj-S	1626,82	92,32	1551,98	77,59	0,88	1
	Kraj-T	Početak-S	1811,10	33,98	1626,82	92,32	2,65	0,42
	Početak-S	Kraj-SO	1626,82	92,32	1752,30	124,99	-1,14	1
	Kraj-SO	Početak-T	1752,30	124,99	1969,64	63,91	-2,19	1
	Kraj-SO	Kraj-TO	1752,30	124,99	1639,61	53,66	1,17	1
	Početak-S	Početak-T	1626,82	92,32	1969,64	63,91	-4,32	1
	Kraj-S	Kraj-SO	1551,98	77,59	1752,30	124,99	-1,93	1
	Kraj-T	Početak-T	1811,10	33,98	1969,64	63,91	-3,10	1
	Kraj-T	Kraj-TO	1811,10	33,98	1639,61	53,66	3,82	0,54
	Kraj-TO	Početak-T	1639,61	53,66	1969,64	63,91	-5,59	1
	Početak-S	Kraj-TO	1626,82	92,32	1639,61	53,66	-0,17	1
	Kraj-T	Kraj-SO	1811,10	33,98	1752,30	124,99	0,64	1

Tablica P9. Rezultati Studentovog *t*-testa za procjenu razlika u alpha raznolikosti (Chao1 indeks) aktivne mikrobne zajednice (cDNA) između različitih tretmana (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). SD – standardna devijacija.

Chao 1 indeks		grupa 1		grupa 2		statistika	
groupa 1	groupa 2	srednja vrijednost	SD	srednja vrijednost	SD	<i>t</i>	<i>p</i>
Početak-S	Početak-T	2079,66	84,48	1968,09	156,35	0,89	1
Početak-S	Kraj-TO	2079,66	84,48	1849,79	101,89	2,46	1
Kraj-SO	Početak-T	1857,97	60,09	1968,09	156,35	-0,93	1
PDt1	Kraj-TO	1901,61	111,36	1849,79	101,89	0,49	1
Kraj-S	Početak-T	1736,23	31,74	1968,09	156,35	-2,06	1
Kraj-T	Početak-S	1768,01	81,34	2079,66	84,48	-3,76	1
Kraj-T	Kraj-TO	1768,01	81,34	1849,79	101,89	-0,89	1
Kraj-S	Kraj-SO	1736,23	31,74	1857,97	60,09	-2,53	1
Kraj-TO	Početak-T	1849,79	101,89	1968,09	156,35	-0,90	1
Kraj-S	Kraj-TO	1736,23	31,74	1849,79	101,89	-1,50	1
Kraj-T	Kraj-SO	1768,01	81,34	1857,97	60,09	-1,26	1
Kraj-T	Početak-T	1768,01	81,34	1968,09	156,35	-1,61	1
Kraj-T	Kraj-S	1768,01	81,34	1736,23	31,74	0,51	1
Početak-S	Kraj-S	2079,66	84,48	1736,23	31,74	5,38	1
Početak-S	Kraj-SO	2079,66	84,48	1857,97	60,09	3,02	1

Tablica P10. Rezultati Studentovog *t*-testa za procjenu razlika u alpha raznolikosti (Shannonov indeks) ukupne mikrobne zajednice (DNA) između različitih tretmana (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). SD – standardna devijacija.

	Shannonov indeks		grupa 1		grupa 2		statistika	
	groupa 1	groupa 2	srednja vrijednost	SD	srednja vrijednost	SD	<i>t</i>	<i>p</i>
DNA	Kraj-S	Kraj-TO	7,08	0,27	7,24	0,18	-0,70	1
	Kraj-T	Kraj-S	7,71	0,10	7,08	0,27	3,07	0,53
	Kraj-S	Početak-T	7,08	0,27	7,94	0,16	-3,87	0,41
	Početak-S	Kraj-S	7,60	0,25	7,08	0,27	2,01	1
	Kraj-T	Početak-S	7,71	0,10	7,60	0,25	0,54	1
	Početak-S	Kraj-SO	7,60	0,25	7,36	0,30	0,87	1
	Kraj-SO	Početak-T	7,36	0,30	7,94	0,16	-2,41	1
	Kraj-SO	Kraj-TO	7,36	0,30	7,24	0,18	0,51	1
	Početak-S	Početak-T	7,60	0,25	7,94	0,16	-1,60	1
	Kraj-S	Kraj-SO	7,08	0,27	7,36	0,30	-1,00	1
	Kraj-T	Početak-T	7,71	0,10	7,94	0,16	-1,73	1
	Kraj-T	Kraj-TO	7,71	0,10	7,24	0,18	3,17	1
	Kraj-TO	Početak-T	7,24	0,18	7,94	0,16	-4,09	1
	Početak-S	Kraj-TO	7,60	0,25	7,24	0,18	1,66	1
	Kraj-T	Kraj-SO	7,71	0,10	7,36	0,30	1,54	1

Tablica P11. Rezultati Studentovog *t*-testa za procjenu razlika u alpha raznolikosti (Shannonov indeks) aktivne mikrobne zajednice (cDNA) između različitih tretmana (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). SD – standardna devijacija.

	Shannonov indeks		grupa 1		grupa 2		statistika	
	groupa 1	groupa 2	srednja vrijednost	SD	srednja vrijednost	SD	<i>t</i>	<i>p</i>
cDNA	Početak-S	Početak-T	7,82	0,20	7,25	0,49	1,51	1
	Početak-S	Kraj-TO	7,82	0,20	7,46	0,03	2,44	1
	Kraj-SO	Početak-T	7,60	0,06	7,25	0,49	0,99	1
	Kraj-SO	Kraj-TO	7,50	0,31	7,46	0,03	0,16	1
	Kraj-S	Početak-T	7,36	0,07	7,25	0,49	0,33	1
	Kraj-T	Početak-S	7,44	0,23	7,82	0,20	-1,74	1
	Kraj-T	Kraj-TO	7,44	0,23	7,46	0,03	-0,11	1
	Kraj-S	Kraj-SO	7,36	0,07	7,60	0,06	-3,71	1
	Kraj-TO	Početak-T	7,46	0,03	7,25	0,49	0,61	1
	Kraj-S	Kraj-TO	7,36	0,07	7,46	0,03	-1,84	1
	Kraj-T	Kraj-SO	7,44	0,23	7,60	0,06	-0,93	1
	Kraj-T	Početak-T	7,44	0,23	7,25	0,49	0,51	1
	Kraj-T	Kraj-S	7,44	0,23	7,36	0,07	0,47	1
	Početak-S	Kraj-S	7,82	0,20	7,36	0,07	2,97	1
	Početak-S	Kraj-SO	7,82	0,20	7,60	0,06	1,48	1

Tablica P12. Zastupljenost bakterijskih koljena (%) u ukupnoj (DNA) zajednici izloženoj različitim eksperimentalnim tretmanima (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). Zastupljenosti ispod 0,01% nisu izražene.

	koljeno	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-TO	Kraj-SO
DNA	Acidobacteria	2,45	2,52	0,97	1,46	1,08	1,22
	Actinobacteria	0,34	0,74	0,38	0,54	0,68	0,47
	Armatimonadetes	0,19	0,15	0,06	0,18	0,13	0,20
	Bacteroidetes	11,60	13,37	15,46	19,08	16,09	15,05
	BRC1	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
	Chlamydiae	0,08	0,10	0,14	0,12	0,16	0,12
	Chloroflexi	0,21	0,31	0,07	0,15	0,13	0,20
	Cyanobacteria	29,44	21,69	21,79	12,74	13,18	24,29
	Deinococcus-Thermus	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
	Dependentiae	0,27	0,36	0,17	0,39	0,24	0,15
	Elusimicrobia	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Fibrobacteres	0,04	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	Firmicutes	7,80	8,84	3,55	5,39	4,55	3,98
	Gemmatimonadetes	1,35	1,74	1,92	2,64	1,79	1,44
	Hydrogenedentes	0,15	0,09	0,09	0,06	0,03	0,09
	Kiritimatiellaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Latescibacteria	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Nanoarchaeaeota	0,00	0,07	0,01	0,03	0,01	0,02
	Nitrospirae	0,41	0,37	0,09	0,24	0,08	0,13
	Omnitrophicaeota	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01
	Patescibacteria	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01
	PAUC34f	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Planctomycetes	3,31	4,79	4,19	3,88	4,40	5,90
	Proteobacteria	33,73	40,04	47,05	48,21	53,88	41,78
	Spirochaetes	0,07	0,10	0,06	0,05	0,02	0,02
	Thaumarchaeota	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Verrucomicrobia	7,07	3,65	3,37	3,93	2,43	3,95
	WPS-2	0,04	0,05	0,06	0,06	0,12	0,09
	Zixibacteria	0,00	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02
	Nepoznato	1,40	0,92	0,53	0,79	0,97	0,83

Tablica P13. Zastupljenost bakterijskih koljena (%) u aktivnoj (cDNA) zajednici izloženoj različitim eksperimentalnim tretmanima (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). Zastupljenosti ispod 0,01% nisu izražene.

	koljeno	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-SO	Kraj-TO
cDNA	Acidobacteria	2,27	1,87	1,20	1,40	1,40	1,42
	Actinobacteria	0,55	0,30	0,42	0,46	0,99	0,66
	Armatimonadetes	0,29	0,19	0,13	0,13	0,16	0,18
	Bacteroidetes	9,51	9,49	13,81	13,01	12,60	14,56
	BRC1	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
	Chlamydiae	0,08	0,03	0,10	0,06	0,12	0,14
	Chloroflexi	0,22	0,16	0,13	0,13	0,21	0,20
	Cyanobacteria	24,82	32,38	16,87	15,35	17,88	15,68
	Deinococcus-Thermus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
	Dependentiae	0,63	0,52	0,57	0,63	0,41	0,50
	Elusimicrobia	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Fibrobacteres	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Firmicutes	22,43	16,75	11,67	12,27	15,19	11,49
	Gemmatimonadetes	1,02	0,71	0,55	0,57	0,40	0,57
	Hydrogenedentes	0,25	0,25	0,49	0,53	0,25	0,37
	Kiritimatiellaeota	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
	Latescibacteria	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03
	Nanoarchaeaeota	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Nitrospirae	0,39	0,24	0,25	0,17	0,20	0,22
	Omnitrophicaeota	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
	Patescibacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	PAUC34f	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Planctomycetes	5,99	6,11	7,94	6,38	8,31	7,52
	Proteobacteria	27,19	25,66	40,89	43,84	37,95	41,16
	Spirochaetes	0,11	0,12	0,06	0,11	0,01	0,03
	Thaumarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Verrucomicrobia	3,82	4,89	4,54	4,55	3,32	4,52
	WPS-2	0,19	0,17	0,30	0,32	0,50	0,67
	Zixibacteria	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01
	Nepoznato	0,17	0,10	0,04	0,05	0,05	0,06

Tablica P14. Zastupljenost bakterijskih razreda (%) u ukupnoj (DNA) zajednici izloženoj različitim eksperimentalnim tretmanima (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). Zastupljenosti ispod 0,01% nisu izražene.

	razred	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-TO	Kraj-SO
DNA	Acidobacteria:						
	Acidobacteriia	0,26	0,49	0,49	0,80	0,58	0,34
	Acidobacteria:						
	Blastocatellia	0,61	0,75	0,20	0,29	0,17	0,46
	Acidobacteria:						
	Holophagae	0,91	0,67	0,01	0,08	0,02	0,01
	Acidobacteria:						
	podgrupa 17	0,03	0,05	0,01	0,00	0,01	0,01
	Acidobacteria:						
	podgrupa 22	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
	Acidobacteria:						
	Subgroup	0,64	0,54	0,26	0,28	0,30	0,40
	Acidobacteria:						
	Thermoanaerobaculia	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Actinobacteria:						
	Acidimicrobiia	0,08	0,12	0,17	0,32	0,31	0,22
	Actinobacteria:						
	Actinobacteria	0,21	0,51	0,19	0,19	0,28	0,21
	Actinobacteria:						
	Thermoleophilia	0,05	0,12	0,02	0,04	0,10	0,04
	Armatimonadetes: --	0,13	0,04	0,01	0,03	0,01	0,04
	Armatimonadetes:						
	Armatimonadia	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02
	Armatimonadetes:						
	Chthonomonadetes	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03
	Armatimonadetes:						
	Fimbriimonadia	0,04	0,09	0,02	0,12	0,09	0,10
	Bacteroidetes:						
	Bacteroidia	11,58	13,19	15,20	18,69	15,89	14,70
	Bacteroidetes:						
	Ignavibacteria	0,02	0,18	0,26	0,39	0,19	0,35
	BRC1: ---	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
	Chlamydiae:						
	Chlamydiae	0,08	0,10	0,14	0,12	0,16	0,12
	Chloroflexi:						
	Anaerolineae	0,14	0,23	0,04	0,09	0,09	0,14
	Chloroflexi:						
	Chloroflexia	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01
	Chloroflexi:						
	Dehalococcoidia	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Chloroflexi: KD4-96	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02
	Chloroflexi: OLB14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Chloroflexi: TK10	0,05	0,04	0,02	0,04	0,03	0,03

Tablica P14. – nastavak.

	razred	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-TO	Kraj-SO
DNA	Cyanobacteria: Melainabacteria	0,24	0,12	0,03	0,02	0,04	0,08
	Cyanobacteria: Oxyphotobacteria	29,10	21,37	21,60	12,42	12,97	24,06
	Cyanobacteria: Sericytochromatia	0,10	0,20	0,15	0,29	0,16	0,15
	Deinococcus- Thermus: Deinococci	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
	Dependentiae: Babeliae	0,27	0,36	0,17	0,39	0,24	0,15
	Elusimicrobia: Elusimicrobia	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Fibrobacteres: Fibrobacteria	0,04	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	Firmicutes: Bacilli	5,70	6,11	3,17	4,36	3,95	3,70
	Firmicutes: BRH- c20a	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
	Firmicutes: Clostridia	2,06	2,69	0,38	1,02	0,61	0,29
	Gemmatimonadetes: ---	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
	Gemmatimonadetes: Gemmatimonadetes	1,34	1,73	1,92	2,63	1,78	1,44
	Hydrogenedentes: Hydrogenedentia	0,15	0,09	0,09	0,06	0,03	0,09
	Kiritimatiellaeota: Kiritimatiellae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Latescibacteria: ---	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Nanoarchaeaeota: Woesearchaeia	0,00	0,07	0,01	0,03	0,01	0,02
	Nitrospirae: Nitrospira	0,41	0,37	0,09	0,24	0,08	0,13
	Omnitrophicaeota: - --	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
	Omnitrophicaeota: Omnitrophia	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
	Patescibacteria: Parcubacteria	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01
	PAUC34f: ---	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Planctomycetes: ---	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	Planctomycetes: BD7-11	0,07	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
	Planctomycetes: linija Pla4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tablica P14. – nastavak.

	razred	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-TO	Kraj-SO
DNA	Planctomycetes: OM190	0,47	0,81	0,40	0,38	0,36	0,37
	Planctomycetes: Phycisphaerae	0,29	0,45	0,33	0,55	0,51	0,45
	Planctomycetes: Planctomycetacia	2,44	3,49	3,43	2,93	3,51	5,00
	Planctomycetes: vadinHA49	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,06
	Proteobacteria: --	0,96	0,40	0,49	0,48	0,57	0,40
	Proteobacteria: Alphaproteobacteria	19,05	25,85	36,55	36,26	38,04	29,59
	Proteobacteria: Deltaproteobacteria	1,52	1,65	1,53	1,80	1,23	1,32
	Proteobacteria: Gammaproteobacteria	12,20	12,14	8,48	9,68	14,04	10,47
	Spirochaetes: Leptospirae	0,07	0,08	0,06	0,05	0,02	0,02
	Spirochaetes: MVP-15	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
	Thaumarchaeota: Nitrososphaeria	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Verrucomicrobia: Verrucomicrobiae	7,07	3,65	3,37	3,93	2,43	3,95
	WPS-2: ---	0,04	0,05	0,06	0,06	0,12	0,09
	Zixibacteria: ---	0,00	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02
	Nepoznato	1,40	0,92	0,53	0,79	0,97	0,83

Tablica P15. Zastupljenost bakterijskih razreda (%) u aktivnoj (cDNA) zajednici izloženoj različitim eksperimentalnim tretmanima (Početak-T – početni uzorak + stalni tok; Početak-S – početni uzorak + suša; Kraj-T – stalni tok bez onečišćenja; Kraj-TO – stalni tok + onečišćenje; Kraj-S – suša bez onečišćenja; Kraj-SO – suša + onečišćenje; Kraj – uzorak uzorkovan 55. dan pokusa). Zastupljenosti ispod 0,01% nisu izražene.

	razred	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-SO	Kraj-TO
cDNA	Acidobacteria:						
	Acidobacteriia	1,01	0,79	0,67	0,63	0,74	0,73
	Acidobacteria: Blastocatellia	0,86	0,79	0,36	0,45	0,28	0,42
	Acidobacteria: Holophagae	0,19	0,06	0,02	0,13	0,04	0,06
	Acidobacteria: podgrupa 17	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01
	Acidobacteria: podgrupa 22	0,00	0,00	0,01	0,02	0,02	0,01
	Acidobacteria: podgrupa 6	0,17	0,20	0,11	0,14	0,15	0,15
	Acidobacteria:						
	Thermoanaerobaculia	0,03	0,03	0,03	0,04	0,17	0,04
	Actinobacteria:						
	Acidimicrobiia	0,24	0,13	0,17	0,21	0,38	0,28
	Actinobacteria:						
	Actinobacteria	0,14	0,09	0,22	0,24	0,54	0,31
	Actinobacteria:						
	Thermoleophilia	0,17	0,07	0,03	0,01	0,07	0,07
	Armatimonadetes: ---	0,16	0,08	0,04	0,04	0,04	0,07
	Armatimonadetes:						
	Armatimonadia	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
	Armatimonadetes:						
	Chthonomonadetes	0,00	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
	Armatimonadetes:						
	Fimbriimonadia	0,11	0,07	0,07	0,05	0,09	0,09
	Bacteroidetes: Bacteroidia	8,73	8,58	12,30	11,49	11,08	12,62
	Bacteroidetes:						
	Ignavibacteria	0,78	0,92	1,51	1,52	1,52	1,93
	BRC1: ---	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
	Chlamydiae: Chlamydiae	0,08	0,03	0,10	0,06	0,12	0,14
	Chloroflexi: Anaerolineae	0,09	0,10	0,06	0,05	0,11	0,08
	Chloroflexi: Chloroflexia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
	Chloroflexi: Dehalococcoidia	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
	Chloroflexi: KD4-96	0,07	0,03	0,01	0,03	0,02	0,05
	Chloroflexi: OLB14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
	Chloroflexi: TK10	0,04	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05

Tablica P15. – nastavak.

	razred	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-SO	Kraj-TO
cDNA	Cyanobacteria: Melainabacteria	0,30	0,20	0,13	0,26	0,14	0,18
	Cyanobacteria: Oxyphotobacteria	24,37	31,93	16,62	14,98	17,63	15,43
	Cyanobacteria: Sericytochromatia	0,14	0,24	0,12	0,12	0,12	0,07
	Deinococcus-Thermus: Deinococci	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
	Dependentiae: Babeliae	0,63	0,52	0,57	0,63	0,41	0,50
	Elusimicrobia: Elusimicrobia	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Fibrobacteres: Fibrobacteria	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Firmicutes: Bacilli	19,52	13,38	11,02	11,35	14,12	10,66
	Firmicutes: BRH-c20a	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Firmicutes: Clostridia	2,88	3,36	0,65	0,92	1,08	0,83
	Gemmatimonadetes: BD2-11	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
	Gemmatimonadetes: Gemmatimonadetes	1,02	0,71	0,54	0,57	0,40	0,57
	Hydrogenedentes: Hydrogenedentia	0,25	0,25	0,49	0,53	0,25	0,37
	Kiritimatiellaeota: Kiritimatiellae	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
	Latescibacteria: ---	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,03
	Nanoarchaeaeota: Woesearchaeia	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Nitrospirae: Nitrospira	0,39	0,24	0,25	0,17	0,20	0,22
	Omnitrophicaeota: ---	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
	Omnitrophicaeota: Omnitrophia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Patescibacteria: Parcubacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	PAUC34f: ---	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	pirochaetes: MVP-15	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
	Planctomycetes: ---	0,20	0,12	0,29	0,26	0,29	0,31
	Planctomycetes: BD7-11	0,02	0,03	0,01	0,00	0,00	0,01

Tablica P15. – nastavak.

	razred	Pocetak-S	Pocetak-T	Kraj-S	Kraj T	Kraj-SO	Kraj-TO
cDNA	Planctomycetes: linija Pla4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Planctomycetes: OM190	0,45	0,49	0,35	0,24	0,21	0,38
	Planctomycetes: Phycisphaerae	0,48	0,45	0,66	0,32	0,39	0,45
	Planctomycetes: Planctomycetacia	4,83	5,02	6,60	5,55	7,37	6,35
	Planctomycetes: vadinHA49	0,01	0,00	0,02	0,01	0,05	0,02
	Proteobacteria: ---	0,16	0,06	0,05	0,04	0,04	0,13
	Proteobacteria: Alphaproteobacteria	15,82	17,40	28,42	32,32	25,97	25,98
	Proteobacteria: Deltaproteobacteria	3,61	1,80	2,92	3,38	2,56	3,22
	Proteobacteria: Gammaproteobacteria	7,60	6,39	9,51	8,10	9,38	11,84
	Spirochaetes: Leptospirae	0,10	0,10	0,06	0,11	0,01	0,01
	Thaumarchaeota: Nitrososphaeria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Verrucomicrobia: Verrucomicrobiae	3,82	4,89	4,54	4,55	3,32	4,52
	WPS-2: ---	0,18	0,17	0,29	0,32	0,49	0,66
	WPS-2: ---	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
	Zixibacteria: ---	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01
	Nepoznato	0,17	0,10	0,04	0,05	0,05	0,06

8. ŽIVOTOPIS

Ivana Grgić rođena je 1994. godine u Bihaću, u Bosni i Hercegovini. U Zagrebu je završila osnovnu školu i gimnaziju te je 2013. godine upisala studijski program Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija bila je aktivni član Udruge studenata – BIUS u kojoj je obnašala ulogu člana Upravnog odbora i voditeljice sekcije za vretenca. Sudjelovala je u tri znanstveno-istraživačka projekta: Papuk 2015, Mura-Drava 2016, Dugi otok 2017. Također, bila je uključena u brojne manifestacije popularizacije znanosti: Znanstveni kvart, Znanstveni piknik, Noć biologije, Dan bioraznolikosti, Otvoreni dani IRB-a. Znanstveni rad započela je na Institutu Ruđer Bošković uključivši se u istraživanje dr. sc. Vlatke Filipović Marijić te je sa Zuzanom Redžović osvojila Rektorovu nagradu Sveučilišta u Zagrebu za studentski istraživački rad. Diplomirala je 2018. godine te se iste godine zaposlila na Institutu Ruđer Bošković na projektu financiranom od Hrvatske zaklade za znanost, u sklopu kojeg je provela istraživanje za doktorski rad. Provela je mjesec dana na Katalonskom institutu za istraživanje voda (Girona, Španjolska) gdje se upoznala s radom na analitičkim instrumentima. Usavršavala se u znanstvenoj komunikaciji, pri čemu je pohađala tri radionice: Science nomad, Summer school - Science communication i Speaking for science. Bila je uključena u organizaciju domaćih i međunarodnih simpozija: 2. Simpozij studenata bioloških usmjerenja, 3. Simpozij o biologiji slatkih voda i 11th Symposium for European Freshwater Sciences. Koautorica je na 7 znanstvenih radova (od kojih je 5 objavljeno u časopisima prvog kvartila i 2 u časopisima drugog kvartila) i 1 stručnog rada, te na 24 sažetka s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Osvojila je financijsku potporu Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti za istraživanje utjecaja mikroplastike, financijsku potporu SETAC Europe društva za prezentiranje dobivenih rezultata na simpoziju te nagradu za najbolje predavanje na 5th Faculty of Science PhD Student Symposium.