Volak Hexaplex trunculus kao bioindikator onečišćenja u Jadranu

Erdelez, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:202631

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

SVEUČILIŠTE U SPLITU, SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU

Poslijediplomski sveučilišni studij Primijenjene znanosti o moru

Anita Erdelez

VOLAK *HEXAPLEX TRUNCULUS* KAO BIOINDIKATOR ONEČIŠĆENJA U JADRANU

Doktorski rad

Split, travanj 2018.

Ova doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju za ribarstvenu biologiju, gospodarenje pridnenim i pelagičkim naseljima Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu te u Laboratoriju za ekotoksikologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Melite Peharde Uljević i komentorice doc. dr. sc. Anamarije Štambuk, u sklopu Međusveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija „Primijenjene znanosti o moru“ pri Sveučilištu u Splitu i Sveučilištu u Dubrovniku.

ZAHVALE

Prije i iznad svega zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Meliti Peharda Uljević na iskazanoj hrabrosti kod prihvaćanja ovog mentorstva, na vođenju kroz cijeli proces izrade rada, na angažiranosti oko organizacije uzorkovanja i laboratorijskih istraživanja, na neiscrpnoj energiji kod čitanja i poboljšavanja rada, na strpljivosti i upornosti te na nesebičnoj podršci od samog početka mog doktorskog studija. Hvala joj na tome što je postala moj prijatelj i uzor.

Zahvaljujem mojoj komentorici doc.dr.sc. Anamariji Štambuk, idejnoj začetnici ovog istraživanja, na ukazanoj prilici da budem dio njega kao i na svesrdnoj pomoći tijekom izrade rada.

Zahvaljujem dr.sc. Martini Furdek Turk na trudu koji je uložila u provedbu analiza vezanih uz butilkositre, na idejama za poboljšanje rada i uopće na nesebičnoj pomoći tijekom pisanja rada. Hvala za recenziju rada u dijelu koji se tiče butilkositara te za učestalo doziranje optimizmom.

Zahvaljujem članovima Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada izv.prof.dr.sc. Ivani Ujević, dr.sc. Nevenki Mikac i doc.dr.sc. Ivanu Županu na korisnim savjetima za unaprjeđenje rada.

Veliko hvala Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu na gostoprimstvu i kolegijalnosti tijekom cijelog doktorskog studija. Zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za ribarstvenu biologiju, gospodarenje pridnenim i pelagičkim naseljima na strpljenju koje su pokazali u 'mokrom labosu' tijekom mojih analiza vezanih uz morfometriju volaka i imposeks. Dr.sc. Ariadni Purroy Albet zahvaljujem na pomoći oko analiza vezanih uz izotope.

Hvala Laboratoriju za ekotoksikologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na gostoprimstvu tijekom istraživanja biomarkera. Posebno hvala doktorandici Dorotei Grbin na trudu, pomoći i strpljenju, kao i dr.sc. Maji Šrut i Ivi Sabolić.

Hvala svim kolegama i prijateljima koji su pomogli oko sakupljanja uzoraka, posebno Ivanu Županu, pok. Antoniju Ursiću, Dajani Brajčić-Jurica, Maru Franušiću, Darku Lovriću, Jasni Šiljić, Zoranu Milosavljeviću i Davoru Alujeviću.

Hvala mojim sadašnjim i bivšim poslodavcima, Fidonu d.o.o. i Institutu IGH d.d., na susretljivosti i razumijevanju u izvršavanju mojih radnih obveza tijekom doktorskog studija. Hvala mojim nadređenima na njihovim savjetima, poticanju na usavršavanje i podršci koju su mi pružali.

Hvala od srca mojim roditeljima koji su bili moja neophodna i besprijekorna logistika tijekom cijelog doktorskog studija i inače.

Hvala mome Andri!

SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA VI
BASIC DOCUMENTATION CARD VII
1. UVOD 1
1.1. Svrha i cilj rada 3
2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE 5
2.1. Općenito o imposeksu 5
2.2. Povezanost imposeksa i tributilkositra 8
2.2.1. Tributilkositar 8
2.2.2. Tributilkositar kao uzročnik imposeksa 10
2.2.3. Zakonska ograničenja korištenja organokositrovih spojeva u protuobraštajnim bojama 12
2.3. Stanični biomarkeri onečišćenja okoliša 14
2.4. Volak *Hexaplex trunculus* 18
2.5. Rasprostranjenost imposeksa i onečišćenost mora organokositrovim spojevima 19
3. MATERIJALI I METODE 23
3.1. Područje i dinamika istraživanja 23
3.2. Biološke analize 25
3.2.1. Morfometrijska obilježja, gonadosomatski i indeks kondicije 25
3.2.2. Imposeks 27
3.2.3. Stanični biomarkeri 29
3.3. Kemijske analize 32
3.3.1. Analiza butilkositrovih spojeva u tkivu volka i sedimentu 32
3.3.2. Analiza stabilnih izotopa u tkivu volka 33
3.4. Statističke analize 34
4. REZULTATI 35
4.1. Prvi dio istraživanja: 2014. godina 35
4.1.1. Morfometrijska obilježja, gonadosomatski indeks i indeks kondicije 35
4.1.2. Imposeks 42
4.1.3. Butilkositrovi spojevi u tkivima volka *Hexaplex trunculus* 46
4.1.4. Povezanost imposeksa i masenog udjela butilkositrovih spojeva kod vrste *Hexaplex trunculus* 50
4.1.5. Biomarkeri oksidativnog stresa 51
4.2. Drugi dio istraživanja: 2015. godina 59
4.2.1. Morfometrijska obilježja, gonadosomatski indeks i indeks kondicije 59
4.2.2. Imposeks 65

4.2.3. Butilkositrovi spojevi u tkivima volka *Hexaplex trunculus* i površinskom sedimentu 68
4.2.4. Povezanost imposeksa i masenog udjela butilkositrovih spojeva kod vrste *Hexaplex trunculus* 72
4.2.5. Stabilni izotopi 74
5. RASPRAVA 77
5.1. Imposeks volka *Hexaplex trunculus* i onečišćenost TBT-om u srednjem dijelu istočne obale Jadrana 77
5.2. Korištenje vrste *Hexaplex trunculus* kao bioindikatora onečišćenja TBT-om u sklopu ocjene ekološkog stanja priobalnih voda prema Direktivi o vodama 83
5.3. Povezanost biomarkera oksidativnog stresa u tkivu volka *Hexaplex trunculus* s imposeksom 87
5.4. Povezanost sadržaja stabilnih izotopa ugljika i dušika u tkivu volka *Hexaplex trunculus* s kategorijom onečišćenosti staništa TBT-om 89
5.5. Razlike u morfometrijskim obilježjima i gonadosomatskom i indeksu kondicije volka *Hexaplex trunculus* s obzirom na kategoriju onečišćenosti staništa TBT-om 90
6. ZAKLJUČAK 93
7. LITERATURA 95
ŽIVOTOPIS AUTORA ..... *VIII*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu, Sveučilišni Odjel za studije mora
Sveučilište u Dubrovniku **Doktorski rad**

Znanstveno područje: Prirodne znanosti; **Znanstveno polje:** Interdisciplinarne prirodne znanosti

VOLAK *HEXAPLEX TRUNCULUS* KAO BIOINDIKATOR ONEČIŠĆENJA U JADRANU

Anita Erdelez

Rad je izrađen u Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu i na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Sažetak

Volak *Hexaplex trunculus* se često koristi za praćenje onečišćenja morskog okoliša organokositrovim spojevima, u prvom redu tributilkositrom (TBT). Radi se o vrsti koja razvija imposeks već pri niskim razinama onečišćenja TBT-om. U ovoj disertaciji predstavljeni su rezultati istraživanja povezanosti imposeksa kod volka *H. trunculus* i onečišćenja TBT-om provedenih na području srednjeg dijela hrvatskog Jadrana na 7 postaja tijekom 2014. godine i 12 postaja tijekom 2015. godine. Kod svih istraživanih populacija zabilježena je pojava imposeksa, a mjerenjem masenog udjela TBT-a u tkivu volka *H. trunculus* i sedimentu potvrđena je i prisutnost onečišćenja TBT-om. Istraživanjem provedenim 2014. godine nije potvrđena povezanost onečišćenja TBT-om s aktivnošću odabranih biomarkera (katalaza, glutation S-transferaza, glutation reduktaza, malondialdehidi, karbonili, acetilkolinesteraza), iako je uočena povećana aktivnost glutation reduktaze i glutation S-transferaze kod volaka s jače onečišćenih postaja. Istraživanje učinkovitosti zabrane korištenja TBT-a, koja je u Republici Hrvatskoj na snazi od 2006. godine, provedeno je 2015. godine na istim postajama na kojima je istraživanje imposeksa provedeno i 2005. godine, kategoriziranim prema razini brodske aktivnosti (nautičke marine, lučice, uvale koje se koriste samo sezonski, referentne postaje koje se rijetko koriste). Rezultati istraživanja sugeriraju da je u desetogodišnjem razdoblju došlo do smanjenja razine onečišćenja TBT-om. Ipak, smanjenje nije rezultiralo oporavkom istraživanih populacija budući da je kod svih utvrđen visoki udio imposeksa kao i povećanje udjela sterilnih ženki. U svrhu potencijalnog korištenja vrste *H. trunculus* kao bioindikatora u ocjeni ekološkog stanja priobalnih voda u okviru Direktive o vodama, a s obzirom na onečišćenje voda TBT-om i posljedičnim razvojem imposeksa, predložene su granične vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) . Istraživanjem stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) i ugljika ($\delta^{13}C_{VPDV}$) u tkivu volka *H. trunculus* nije potvrđena povezanost sadržaja stabilnih izotopa sa stupnjem onečišćenosti istraživanih postaja TBT-om.

(112 stranica, 47 slika, 9 tablica, 202 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu i knjižnici Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Ključne riječi: biomarkeri, *Hexaplex trunculus*, imposeks, ocjena ekološkog stanja priobalnih voda, onečišćenje TBT-om, srednji Jadran, stabilni izotopi

Mentor: Prof.dr.sc. Melita Peharda Uljević, redovni profesor
Komentor: Dr.sc. Anamaria Štambuk, docent

Ocjenjivači: 1. Prof.dr.sc. Ivana Ujević, izvanredni profesor
2. Dr.sc. Nevenka Mikac, znanstvena savjetnica
3. Dr.sc. Ivan Župan, docent

Rad prihvaćen: 21. ožujka 2018. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split, University Department of Marine Studies
University of Dubrovnik **Ph.D. thesis**

Ph.D. in Natural sciences, research field Interdisciplinary Natural Sciences

BANDED MUREX *HEXAPLEX TRUNCULUS* AS BIOINDICATOR OF CONTAMINATION IN THE ADRIATIC

Anita Erdelez

Thesis performed at the Institute of Oceanography and Fisheries, Split and at the Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Abstract

Banded murex *Hexaplex trunculus* is used in the marine environment monitoring of organotin pollution, as this species develops imposex at very low tribytiltin (TBT) concentration. In this thesis relationship between imposex in *H. trunculus* and TBT pollution was investigated along the central Croatian Adriatic coast at 7 sites in 2014 and 12 sites in 2015. Imposex was recorded at all investigated sites on which also TBT pollution was demonstrated, both in tissue of *H. trunculus* and in sediment. Investigations performed in year 2014 showed no connection between degree of TBT pollution and activity of specific biomarkers (catalase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, malondialdehydes, carbonyls, acetylcholinesterase) in gastropod, although the increased activity of glutathione reductase and glutathione S-transferase in banded murex from the most polluted sites was observed. Investigation on effectiveness of the ban of organotin compounds in antifouling coatings, which is in force in the Republic of Croatia since 2006, was performed in 2015 at the same sites previously investigated in 2005 which were categorized according to intensity of boating activities to nautical marinas, village harbours, sheltered bays and reference sites. Obtained results suggested that TBT pollution has decreased in this ten years period. However, this decrease was not sufficient for the recovery of *H. trunculus* populations, since in 2015 all populations showed high degree of imposex and even higher number of sterile females than in 2005. The Ecological Quality Ratio (EQR) values for the potential use of imposex in *H. trunculus* as bioindicator in assessment of the ecological status of coastal waters regarding TBT pollution in the frame of Water Framework Directive (WFD) are proposed. Relationship between carbon ($\delta^{13}C_{VPDV}$) and nitrogen ($\delta^{15}N_{air}$) isotopes content in *H. trunculus* and degree of TBT pollution was not established.

(112 pages, 47 figures, 9 tables, 202 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in National and University Library in Zagreb, Split University Library, and Library of Institute of Oceanography and Fisheries in Split.

Keywords: assessment of the ecological status of coastal waters, biomarkers, central Adriatic, *Hexaplex trunculus*, imposex, stable isotopes, TBT pollution

Supervisor: Prof. Melita Peharda Uljević Ph.D. / Full Professor
Assistant Supervisor: Anamaria Štambuk Ph.D. / Assistant Professor

Reviewers: 1. Prof. Ivana Ujević Ph.D., Associate Professor
2. Nevenka Mikac Ph.D., Senior Scientist
3. Ivan Župan Ph.D., Assistant Professor

Thesis accepted: 21st March 2018

1. UVOD

Praćenje stanja morskog okoliša danas osim konvencionalnih mjerenja fizikalnih i kemijskih parametara treba uključivati i praćenje učinaka onečišćenja (Sanchez i sur., 2012). Naime, pojedine vrste predvidljivo reagiraju na antropogeno uvjetovane poremećaje u okolišu i to ih čini pogodnim za biomonitoring. Takve vrste koje putem specifičnih biomarkera ili procesom bioakumulacije toksičnih tvari reagiraju na stres u okolišu nazivaju se bioindikatori onečišćenja (Gerhard, 2002). Stanični biomarkeri predstavljaju rane znakove upozorenja na pojedina onečišćivala budući da se prve promjene događaju već nakon kratkog vremena djelovanja onečišćivala na staničnoj razini (Domouhtsidou & Dimitriadis, 2001). S ciljem očuvanja morskog okoliša usvojeno je niz konvencija, direktiva i nacionalnih regulativa. I premda su suvremena istraživanja usmjerena na učinak novijih komercijalnih kemijskih spojeva na okoliš (Scott i sur., 2012; Hutchinson i sur., 2013), prisutnost "starih" onečišćivala poput organokositrovih spojeva i dalje se bilježi (Kim i sur., 2014; Suzdalev i sur., 2015; Primost i sur., 2016).

Organokositrovi spojevi, posebno tributilkositar (TBT), u morski okoliš dospijevaju putem protuobraštajnih premaza. TBT može uzrokovati različite biološke učinke na neciljane organizme, a jedan od najbolje istraženih toksičnih učinka je pojava imposeksa kod prednjoškržnih puževa (Bryan i sur., 1987; Omae, 2003). Imposeks je razvoj muških spolnih organa u ženki puževa (Smith, 1971). Dosadašnja istraživanja pokazala su da neke vrste puževa razvijaju imposeks već pri masenoj koncentraciji TBT-a u vodi od 1 ng Sn L^{-1} (Gibbs i sur., 1988) i da se intenzitet imposeksa povećava s porastom TBT-a u vodi i povećanjem bioakumuliranog TBT-a (Bryan i sur., 1987; Oehlmann i sur., 1998a). Pri većim koncentracijama TBT-a javljaju se viši stadiji imposeksa, što ozbiljno ugrožava reproduktivnu sposobnost ženki te obnovu i strukturu populacija (Gibbs i sur., 1988).

Volak *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) je vrsta puža (Gastropoda) koja je široko rasprostranjena u Sredozemnom moru. Ova vrsta naseljava litoral, ima ograničenu pokretljivost, nema planktonsku larvalnu fazu i razvija imposeks već pri masenom udjelu bioakumuliranog TBT-a nižoj od 1 ng Sn g^{-1} suhe tvari (s.t.) (Axiak i sur., 1995). Sve ove značajke čine vrstu *H. trunculus* jednim od najosjetljivijih bioindikatora onečišćenja TBT-om. Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća imposeks kod volka *H. trunculus* često je istraživan u vezi s onečišćenjem TBT-om u mnogim zemljama na Sredozemnom moru, uključujući Maltu (Axiak i sur., 1995, 2003), Italiju (Terlizzi i sur., 1998, 1999; Chiavarini i sur., 2003; Terlizzi i sur., 2004; Pelizzato i sur., 2004; Garaventa i sur., 2006a, 2007), Izrael (Rilov i sur., 2000), Portugal (Vasconcelos i sur., 2006a), Hrvatsku (Prime i sur., 2006; Garaventa i sur., 2006a, 2007; Stagličić i sur., 2008) i Tunis (Lahbib i sur.,

2007, 2009a, 2010a). Većina ovih istraživanja bavila se rasprostranjenošću pojave imposeksa kao posljedice onečišćenja morskog okoliša TBT-om.

Budući da organokositrovi spojevi imaju negativan utjecaj na neciljane organizme, prvenstveno puževe i školjkaše, njihovo korištenje u protuobraštajnim premazima danas je zabranjeno u mnogim državama svijeta uključivo cijelu Europu (Champ, 2000; Furdek i sur., 2012). Međunarodnom Konvencijom o nadzoru štetnih sustava protiv obraštanja brodova od 2008. godine zabranjeni su svi protuobraštajni premazi koji sadrže organokositrove spojeve. Republika Hrvatska je ratificirala Konvenciju u 2006. godini i iste godine TBT je uključen na Listu opasnih kemikalija čiji je promet zabranjen odnosno ograničen (Narodne novine 17/2006). U skladu s Konvencijom, od 2008. godine u hrvatske luke zabranjen je ulazak brodova čiji protuobraštajni premazi sadrže organokositrove spojeve kroz Pravilnik o uvjetima i načinu održavanja reda u lukama i na ostalim dijelovima unutarnjih morskih voda i teritorijalnog mora Republike Hrvatske (Narodne novine 90/2005, 10/2008, 155/2008, 127/2010, 80/2012, 7/2017). Europska unija zabranila je korištenje organokositrovih spojeva kroz Direktivu 2002/62/EZ i Zakon EZ/782/2003. U Aneksu VIII Direktive o vodama 2000/60/EC organokositrovi spojevi su proglašeni jednim od glavnih onečišćivala, a TBT jednom od prioritetnih tvari u području vodnog gospodarstva (2455/2001/EZ) koju treba pratiti kako bi se ocijenilo kemijsko stanje vodnih tijela. Prisutnost TBT-a u vodama u Republici Hrvatskoj regulirana je propisivanjem standarda kakvoće okoliša (SKVO) za ocjenu kemijskog stanja voda u vidu prosječne godišnje koncentracije (PGK) i najveće godišnje koncentracije (MGK) tributilkositrovih spojeva kroz Uredbu o standardu kakvoće voda (Narodne novine 73/2013, 151/2014, 78/2015, 61/2016). Imajući u vidu da je definirana prosječna godišnja masena koncentracija TBT-a vrlo niska i za priobalne vode iznosi 0,2 ng TBT L^{-1} za cijelu Europu, kemijske analize organokositrovih spojeva pri takvim koncentracijama obično je teško provesti čak i kad se radi o najosjetljivijim analitičkim metodama. Zbog toga je imposeks kao biološki odgovor na TBT kod puževa vrijedan alat u procjeni stupnja onečišćenja i utjecaja TBT-a na morski okoliš te je kao takav postao obvezni kriterij unutar OSPAR programa praćenja stanja morskog okoliša atlantske i baltičke obale (OSPAR, 2004). Nadalje, imposeks je predložen kao jedan od bioloških elemenata kvalitete koji bi se mogao koristiti za vrednovanje i klasifikaciju ekološkog stanja priobalnih voda u programima praćenja stanja voda koje nalaže Direktiva o vodama (WFD-UKTAG, 2014).

Značajne masene koncentracije TBT-a još uvijek se bilježe na mnogim lokacijama čak i godinama nakon zabrane njegova korištenja u protuobraštajnim premazima (Kim i sur., 2014; Pougnet i sur., 2014), što je često povezano s resuspenzijom onečišćenog sedimenta i/ili mogućim novim unosima (Furdek i sur., 2012; Langston i sur., 2015; Suzdalev i sur., 2015). Ipak, zakonska

ograničenja rezultirala su oporavkom mnogih populacija puževa duž europske atlantske obale, uključujući vrste *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758), *Tritia reticulata* (Linnaeus, 1758), *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867) i *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767), koje su sve ranije bile značajno pogođene imposeksom (Evans i sur., 1996; Birchenough i sur., 2002; Huet i sur., 2004; Bray i sur., 2011; Cuevas i sur., 2014; Langston i sur., 2015; Laranjeiro i sur., 2015; Nicolaus & Barry, 2015). Suprotno tome, Guðmundsdóttir i suradnici (2011) predstavili su podatke o povećanju razina imposeksa u blizini nekoliko manjih luka na Islandu nakon uvođenja zakonskih ograničenja. Iako je nekoliko nedavnih istraživanja izvijestilo o rasprostranjenoj pojavi imposeksa kod populacija puževa u Sredozemnom moru, npr. u Tunisu i Sardiniji (Abidli i sur., 2013; Anastasiou i sur., 2015; Boulajfene i sur., 2015), podataka o vremenskim trendovima statusa imposeksa u Sredozemnom moru koji ukazuju na učinke zabrane korištenja TBT-a je vrlo malo. Lahbib i suradnici (2009a) usporedbom pojave imposeksa u 2004. i 2007. godini na nekoliko lokacija uz tunisku obalu uočavaju oporavak kod većine populacija. Vremenski trendovi koji ukazuju na promjenu intenziteta pojave imposeksa u Jadranu nakon zabrane također nisu dostupni. Podatci o izmjerenim masenim koncentracijama i udjelima TBT-a u moru i dagnjama u razdoblju 2009-2010. godine, tj., nakon uvedenih zabrana, pokazuju da je istočni Jadran još uvijek onečišćen organokositrovim spojevima (Furdek i sur., 2012).

1.1. Svrha i cilj rada

Glavni cilj doktorskog rada je istražiti učinkovitost zabrane korištenja tributilkositra (TBT) u protuobraštajnim premazima za brodove koja je u Republici Hrvatskoj na snazi od 2006. godine korištenjem volka *Hexaplex trunculus* kao bioindikatorske vrste. Usporedbom udjela imposeksa zabilježenog u istraživanju provedenom 2005. godine (Prime i sur., 2006) na 12 postaja na području srednjeg dijela hrvatskog Jadrana s rezultatima istraživanja provedenog 10 godina kasnije na istim istraživačkim postajama, utvrđen je vremenski trend pojavljivanja imposeksa. Sve postaje su kategorizirane s obzirom na razinu intenziteta brodskog prometa. Budući da je poznato da vrsta *H. trunculus* imposeksom reagira na niske razine TBT-a u morskom okolišu, istražena je korelacija imposeksa s masenim udjelom butilkositara u tkivu volka i sedimentu s istraživanih postaja. Predmetno istraživanje je prvo istraživanje udjela organokositrovih spojeva u tkivu vrste *H. trunculus* u hrvatskom dijelu srednjeg Jadrana.

Sljedeći cilj je istraživanje povezanosti aktivnosti odabranih staničnih biomarkera volka *H. trunculus* i imposeksa odnosno stupnja onečišćenja TBT-om. Ovim istraživanjem analizirana je povezanost imposeksa s aktivnosti enzimatskog sustava vrste *H. trunculus*. Istražena je aktivnost

biomarkera oksidacijskog stresa koji se javlja uslijed izloženosti organizma ksenobioticima: glutation (GSH), glutation S-tranferaza (GST), glutation reduktaza (GR), katalaza (CAT), karbonili, malondialdehidi (MDA) i acetilkolinesteraza (AChE).

Konačno, istraživanje uključuje i analizu povezanosti ishrane volka i kategorije postaje uzorkovanja s obzirom na stupanj onečišćenja TBT-om, odnosno pojavnosti imposeksa. Cilj je i istražiti moguće razlike u sastavu stabilnih izotopa ugljika i dušika u mišićnom tkivu, što ukazuje na različite izvore hrane te moguću povezanost različite ishrane i pojave imposeksa.

2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE

2.1. Općenito o imposeksu

Fenomen imposeksa prvi spominje Smith (1971). Proučavajući jedinke vrste prednjoškržnog puža *Tritia obsoleta* (Say, 1822) sakupljene u Southportu i Westportu, Conneticut, SAD, otkrio je kod ženki pojavu strukture koja nalikuje penisu. Ovu pojavu naziva imposeks jer se "javlja kao superimpozicija muških značajki na ženkama napadnutim i nenapadnutim parazitima". Općenito, s aspekta spolnosti prednjoškržni puževi ovisno o vrsti imaju jedan od dva oblika spolnosti: 1) ambispolnost ili hermafrodizam i 2) razdvojenu spolnost ili gonohorizam (Coe, 1944). Coe (1944) hermafrodizam dijeli u četiri kategorije: funkcionalni hermafrodizam, uzastopna spolnost, ritmička uzastopna spolnost i alternativna spolnost. Većina puževa posjeduje penis, ili zato što je muškog spola ili zato što je hermafrodit. Kod funkcionalnog hermafrodizma svaka jedinka posjeduje potpuni set organa oba spola. Kod uzastopne spolnosti događa se jedna promjena spola tijekom života jedinke, normalno je da je početna faza muška, a odrasla ženska ili hermafrodična. Kod ritmičke uzastopne spolnosti jedinka je morfološki hermafrodit s visokim stupnjem razdvojenosti reproduktivnih organa oba spola, i spolne stanice se stvaraju sukcesivno, a ne simultano, u svakom razdoblju mriještenja sperma se otpušta prije nego jajne stanice postanu potpuno zrele. Kod alternativne spolnosti mlađe jedinke su većinom funkcionalno muške, dok su starije većinom u ženskoj fazi. Pojava imposeksa moguća je kod vrsta koje karakterizira razdvojena spolnost. Imposeks predstavlja rast muških spolnih organa (penis, sjemenovod ili vas deferens) na ženkama te rezultira zakrivljenjem jajovoda kao posljedici rasta muških spolnih organa (Smith, 1981b). Kad u kasnim stadijima imposeksa kod nekih vrsta, npr. *Nucella lapillus* (Spence i sur., 1990), sjemenovod preraste vaginalni otvor i zatvori ga, onemogućen je izlazak jajne kapsule što dovodi do sterilnosti, a ponekad i uginuća ženki, te izumiranja populacije. Ovisno o mehanizmu nastanka, tri su osnovna tipa steriliteta uzrokovanog imposeksom (Shi i sur., 2005): 1) zamjena vulve žlijezdom prostatom, 2) blokada vaginalnog otvora sjemenovodom, 3) rascjep kapsularne žlijezde; te je za svaki od njih definiran dodatni podtip koji uključuje blokadu palijalnog jajovoda unutrašnjom promjenom ili proksimalnim sjemenovodom, pri čemu jedna vrsta može imati više mehanizama nastanka steriliteta.

Reproduktivne anomalije kod prednjoškržnih puževa u istraživanjima nakon otkrića imposeksa povezuje se s onečišćenjem iz luka (Smith, 1981a, 1981b, 1981c). Uočena je veza između intenziteta pojave imposeksa i udaljenosti jedinki od luka što je dovelo do zaključka da neke tvari iz protuobraštajnih boja koje su se koristile za premaze plovila i opreme u marikulturi

potencijalno uzrokuju imposeks (Smith, 1981b). Laboratorijskim pokusima utvrđeno je da se radi o tributilkositru (TBT), (Smith, 1981c). Nadalje, potvrđeno je da premještanjem imposeksom "zaraženih" puževa iz luka u nezagađeno morsko područje dolazi do manjeg smanjenja penisa, ali ne i potpunog povlačenja imposeksa, na temelju čega je donesen zaključak da imposeks predstavlja ireverzibilnu pojavu (Smith, 1981b).

Do danas imposeks je zabilježen kod oko 250 vrsta puževa i smatra se globalnim fenomenom (Titley-O'Neal i sur., 2011). Ho i Leung (2012) su istraživali povezanost imposeksa kod vrste *Reishia clavigera* (Küster, 1860) sa šest organokositrovih spojeva, TBT-om, dibutilkositrom (DBT), monobutilkositrom (MBT), trifenilkositrom (TPT), difenilkositrom (DPT) i monofenilkositrom (MPT), te zaključili da TBT i TPT imaju snažan učinak na razvijanje imposeksa. Ipak, kod tumačenja uzroka imposeksa treba biti oprezan budući da organokositrovi spojevi nisu njegovi jedini uzročnici. Evans i suradnici (1995) daju pregled istraživanja u kojima nije pronađena korelacija između stadija imposeksa i masene koncentracije organokositrovih spojeva u tkivu puževa. Pokazalo se da imposeks, osim TBT-a, mogu uzrokovati i bakar i okolišni stres (Nias i sur., 1993). Nadalje, na stadij imposeksa vrste *N. lapillus* može utjecati i postojanje parazita u jedinkama zahvaćenim imposeksom (Schulte-Oehlmann i sur., 1997; Evans i sur., 2000). Garaventa i suradnici (2006b) su na nekoliko muzejskih primjeraka vrste *Hexaplex trunculus* prikupljenim na području Sredozemnog mora u razdoblju od 1845. do 1930. godine ustanovili znakove imposeksa premda u tom razdoblju TBT još nije bio u primjeni.

Pri istraživanju imposeksa kod vrste *N. lapillus* na području jugoistočne obale Engleske, Gibbs (1993) nailazi na populaciju pogođenu tzv. Dumpton sindromom (DS). Radi se o sindromu nerazvijenosti muških spolnih organa, bilo kod mužjaka, bilo kod imposeksom pogođenih ženki, koji se očituje u nedovoljno razvijenom sjemenovodu, prostati s podijeljenom strukturom i u najekstremnijim slučajevima nedostatku penisa. Dumpton sindromom je genetski poremećaj koji zbog slabijeg razvoja muških spolnih organa ublažava pojavu sterilnosti kao zadnjeg stadija imposeksa i time omogućava preživljavanje populacija u područjima s izraženim onečišćenjem TBT-om. Populacije s DS-om pronađene su na engleskoj i francuskoj obali Engleskog kanala te u Galiciji (Gibbs, 1993; Huet i sur., 1996; Barreiro i sur., 1999). Naknadna laboratorijska istraživanja jedinki vrste *N. lapillus* s DS-om pokazala su da su mužjaci s DS-om impotentni te da se održanje populacije pogođene DS-om održava križanjem ženki koje imaju DS i mužjaka koji nemaju DS (Gibbs, 2005). Zasad nema objašnjenja zašto neke ženke s DS-om ostanu nepogođene imposeksom, a neke druge u istoj populaciji dosegnu stadij sterilnosti uslijed imposeksa (Barreiro i sur., 1999). Zanimljivo je i da je kod vrste slatkovodnog puža *Heleobia hatcheri* zabilježen prirodni imposeks (Martin, 2002).

Svakako treba spomenuti i pojavu interseksa koja je vrlo bliska pojavi imposeksa. Naime, kod vrste *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) pod utjecajem TBT-a ne razvija se imposeks već interseks (Bauer i sur., 1995). Radi se o pojavi koja se očituje u preobrazbi palijalnog jajovoda prema muškoj morfološkoj strukturi. Olakšavajuća okolnost za očuvanje populacija vrste *L. littorea* je što se ova vrsta razmnožava putem planktonske jajne kapsule pa se bez obzira na udio sterilnih ženki populacija može obnoviti dolaskom jajnih kapsula iz susjednih populacija (Oehlmann i sur., 1998b).

U prvim radovima u kojima je istraživan imposeks kod vrste *Tritia obsoleta*, imposeks se ocjenjivao učestalošću pojave imposeksa u uzorku i prosječnim intenzitetom muških značajki kod ženki svrstavanjem u jednu od deset kategorija prema kriteriju prisutnosti i veličine pojedinih anatomskih značajki penisa (Smith, 1981b). Nakon toga u istraživanjima za ocjenu imposeksa uobičajeno se koriste indeksi relativne veličine penisa (RPSI, eng. *Relative Penis Size Index*) i vas deferensa (VDSI, eng. *Vas Deferens Sequence Index*) koje su postavili Gibbs i suradnici (1987) za vrstu *Nucella lapillus*. Indeks RPSI uspoređuje kubnu duljinu ženskog i muškog penisa u istraživanom uzorku:

RPSI = ((prosječna duljina ženskog penisa)^3/ (prosječna duljina muškog penisa)^3) x 100

Indeks VDSI se izračunava na temelju stadija kojima se opisuje razvijenost sjemenovoda. Za različite vrste puževa u literaturi su definirane različite klasifikacije stadija imposeksa, a najčešće se radi o 6 do 7 stadija (npr. indeksi 0-6). Niži stadiji predstavljaju početnu pojavu sjemenovoda, dok viši predstavljaju sjemenovod koji je prerastao vaginalni otvor i ponekad doveo do razdjeljivanja kapsularne žlijezde što rezultira sterilitetom ženke. Početne klasifikacije stadija često se s vremenom dopunjavaju budući da se uočavaju podtipovi pojedinih stadija. Indeks VDSI po definiciji predstavlja srednju vrijednost svih stadija imposeksa u uzorku:

VDSI = (suma vrijednosti stadija imposeksa svih ženki)/(broj ženki u istraživanoj populaciji)

Nešto kasnije uveden je i indeks relativne duljine penisa (RPLI, eng. *Relative Penis Lenght Index*) koji predstavlja omjer prosječne duljine ženskog penisa i prosječne duljine muškog penisa izražen kao postotak (Stroben i sur., 1992):

RPLI = (prosječna duljina ženskog penisa)/(prosječna duljina muškog penisa) x 100

Barreiro i suradnici (2001) koriste se i indeksom pod nazivom prosječni stadij jajovoda (AOS, engl. *Average Oviduct Stage*) koji predstavlja srednju vrijednost stadija maskulinizacije jajovoda i autori ga smatraju pogodnim za korištenje u vrlo onečišćenim područjima nakon što RPLI i VDSI dosegnu svoju gornju granicu.

Kod tumačenja indeksa koji se primjenjuju za ocjenu imposeksa treba voditi računa o više čimbenika. Indeks VDSI se ponekad favorizira pred indeksima RPSI i RPLI jer nije ovisan o

sezoni uzorkovanja (sjemenovod se ne mijenja sezonski za razliku od penisa) i omogućava dobru procjenu ugroženosti razmnožavanja ženki s imposeksom (Oehlmann i sur., 1998a, b). Indeksi vezani uz duljinu penisa kod vrste *N. lapillus* nisu podložni samo sezonskim promjenama već i promjenama koje su posljedica male udaljenosti između neke jedinke i klastera jajnih kapsula – naime mužjaci koji se nalaze blizu klastera imaju duže penise (Galante-Oliveira i sur., 2010). Ipak, Pellizzato i suradnici (2004) preferiraju RPSI kad uspoređuju onečišćene lokacije zato što RPSI ima veći raspon varijacije od VDSI, budući da se VDSI nakon postizanja krajnjeg stadija imposeksa ne može povećati bez obzira na daljnje povećanje onečišćenja. Kod postojanja Dumpton sindroma, pri izračunu indeksa RPSI jedinke s DS-om treba zanemariti, dok se iste ne smije zanemariti u slučaju ocjene učinka imposeksa na neku populaciju (Barreiro i sur., 1999). Nadalje, jedinke napadnute parazitima treba isključiti pri izračunu indeksa VDSI jer parazitizam povećava vrijednost indeksa (Schulte-Oehlmann i sur., 1997). Za ocjenu interseksa koristi se interseks indeks ISI koji predstavlja srednji interseks stadij u uzorku (Σ interseks stadija u uzorku/broj ženki), (Bauer i sur., 1995).

2.2. Povezanost imposeksa i tributilkositra

2.2.1. Tributilkositar

Metali pripadaju grupi konzervativnih onečišćivala što znači da nisu podložni razgradnji. Iako su metali prirodno prisutni u okolišu, povišene koncentracije ekotoksičnih metala mogu biti toksične za žive organizme u kojima se akumuliraju (Carballeira i sur., 2000). Anorganski kositar nije toksičan, što nije slučaj s organokositrovim spojevima među koje spada i tributilkostar (TBT) (Hoch, 2001). Iako je kositar važan za čovječanstvo još od brončanog doba, za organokositrove spojeve se zna tek zadnjih 150 godina. Hoch (2001) u preglednom radu o organokositrovim spojevima navodi da je do danas poznato više od 800 organokositrovih spojeva, od kojih se najveći dio primjenjuje u proizvodnji polivinil klorida (PVC). Obzirom da organokositrovi spojevi posjeduju biocidna svojstva, osim u protuobraštajnim premazima za brodove, koriste se za zaštitu drva, te kao fungicidi i insekticidi. Za razliku od kositra koji se u svom anorganskom obliku općenito smatra netoksičnim, trialkilkositrovi spojevi tributil-, trifenil-, i tricikloheksil-kositar posjeduju značajna biocidna svojstva. Toksičnost trialkilkositrovih spojeva kao najtoksičnijih među organokositrovim spojevima, varira ovisno o strukturi i duljini lanca alkilnih grupa.

Organokositrovi spojevi se sastoje od jedne do četiri organske grupe vezane na atom kositra (Sn^{4+}) ugljik-kositar kovalentnim vezama. Broj Sn-C veza i duljina alkilnih lanaca određuju

kemijske i fizikalne značajke organoskoritrovih spojeva (Hoch, 2001). Organokositrovi spojevi imaju sljedeće opće formule: $RSnX_3$, R_2SnX_2, R_3SnX i R_4Sn, gdje je R bilo koja alkilna (ili arilna) grupa, a X je anion kao npr. acetat, karbonat, klorid, fluorid, hidroksid, oksid ili sulfid. Tributilkositar ima visok toksični učinak na vodene organizme, a formula njegovog kationa je $(C_4H_9)_3Sn^+$. Veza Sn-C je stabilna u prisutnosti vode, atmosferskog kisika i topline (Hoch, 2001). Topivost organokositrovih spojeva u vodi je vrlo niska i ovisi o oksido-redukcijskom potencijalu, pH, temperaturi, ionskoj jakosti, koncentraciji te sastavu otopljene organske tvari u vodi (USEPA, 2003). Razgradnjom organokositrovi spojevi gube organske grupe s kationa kositra. Tako se tributilkositar u morskom okolišu u odgovarajućim uvjetima raspada na manje toksične spojeve, dibutilkositar (DBT) i monobutilkositar (MBT) (Alzieu, 1998; Antizar-Ladislao, 2008) i konačno na anorganski kositar. Organokositrovi spojevi se u vodi razgrađuju procesom fotolize koja se događa djelovanjem sunčeve svjetlosti i mikroorganizama (Alzieu, 1998; Antizar-Ladislao, 2008; Hoch, 2001). Poluvijek razgradnje TBT-a u vodnom stupcu je od nekoliko dana do nekoliko tjedana (Stewart & De Mora, 1990), dok je u sedimentu nekoliko godina (De Mora i sur., 1995), a prema nekim autorima čak i nekoliko desetljeća (Omae, 2003), pa u sedimentu dolazi do aktivacije mogućeg ponovnog onečišćenja vodnog stupca (Langston i sur., 1990). Koeficijent raspodjele TBT-a sediment-voda (K_d) ovisi najviše o tipu sedimenta, veća adsorpcija se događa u sitnijim organski bogatijim sedimentima (Furdek, 2015; Furdek i sur., 2016), iako utjecaj imaju i pH te salinitet (Pope, 1998). Onečišćeni sediment zbog moguće remobilizacije onečišćivala predstavlja stalni rizik za ponovno onečišćenje vodnog stupca. Brosillon i suradnici (2014) navode da se organokositrovi spojevi adsorbirani na morski sediment mogu razgraditi fotokatalizom[1] uz dodatak hidroksilnih radikala. Razgradnja butilkositrovih spojeva u sedimentu odvija se prije svega u pornoj vodi (Furdek, 2015; Furdek i sur, 2016).

Tributilkositar se od sedamdesetih godina prošlog stoljeća zbog svojih biocidnih svojstava koristio u protuobraštajnim premazima brodova. Kako bi se spriječio obraštaj, brodovi se premazuju bojama koje imaju stalni prag otpuštanja biocida i koje su učinkovite nekoliko godina. Samoobnavljajuće boje koje u sebi sadrže TBT omogućile su trajnost premaza i do 5 godina (Terlizzi i sur., 2001) čime su smanjeni troškovi održavanja brodova. Radi se o visoko toksičnom biocidu čija toksičnost u morskom okolišu osim ciljnih organizama pogađa i druge organizme, u prvom redu puževe i školjkaše. Kod kamenica *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) TBT uzrokuje anomalije u rastu (Alzieu & Heral, 1984), dok se kod mnogih vrsta puževa javlja imposeks.

[1] Fotokataliza, odnosno heterogena fotokatalitička razgradnja tvari adsorbiranih na katalizatoru pod utjecajem solarnog zračenja (UV/katalizator) sa ili bez dodataka oksidacijskih sredstava.

Otpuštanje TBT-a iz protuobraštajnih boja iznosi 1-10 μg TBT cm^{-2} trupa broda dnevno, što je 0,2-2 g dnevno za male brodove, i 50-500 g dnevno za velike brodove (Alzieu, 1998).

Bioakumulacija organokositrovih spojeva posljedica je njihovog lipofilnog karaktera. Istraživanja su pokazala da neke morske bakterije imaju visoku sposobnost akumuliranja TBT-a. Školjkaši akumuliraju preko 5 μg g^{-1} TBT-a za razliku od rakova i riba koji akumuliraju manje količine zahvaljujući svojoj sposobnosti razgradnje TBT-a na DBT i MBT (Alzieu, 1998; Hoch, 2001). Hoch (2001) navodi da se TBT u vodene organizme uglavnom iz vode unosi kroz membranu i sluznicu, a kod organizama više trofičke razine i putem hrane. Organokositrovi spojevi se adsorbiraju na otopljene čestice u vodi i na fine čestice sedimenta te su tako raspoloživi pelagičkim i bentoskim organizmima koji TBT akumuliraju i iz sedimenta i iz vode, no prvenstveno iz vode i to putem respiratornih površina (Pope, 1998). Zbog visokih masenih udjela TBT-a akumuliranog u sedimentu organizami koji žive na ili blizu sedimenta izloženi su povećanoj kontaminaciji kako su pokazali Strand & Jacobsen (2005) na primjeru trifenilkositra. Kod vrste *T. reticulata* važan put akumuliranja TBT-a iz sedimenta je kroz glavu i stopalo, a značajno manje preko hrane odnosno ingestijom sedimenta (Pope, 1998). Općenito, neki organizmi unose TBT značajnije preko površine tijela nego preko hrane (Rüdel, 2003), dok je kod nekih drugih vrsta morskih organizama, kao na primjer kod raka *Rhithropanopeus harrisii* (Gould, 1841), utvđeno da se TBT akumulira uglavnom putem hrane (Rüdel, 2003). Maseni udio TBT-a u tkivu puževa obično raste s masenom koncentracijom TBT-a u moru, kao što je slučaj kod vrste *Tritia incrassata* (Strøm, 1768) (Oehlmann i sur., 1998a). Bioakumulacija ovisi o tri glavna čimbenika (Viglino i sur., 2006): 1) stupnju onečišćenosti staništa, 2) načinu unosa (voda/sediment/prehrana), 3) mogućnosti metabolizma da razgradi TBT. Oehlmann i suradnici (1998a) ukazuju na veći faktor biokoncentracije kod predatorskih vrsta u odnosu na biljojede što pojašnjavaju trofičkom razinom hrane koja se uzima. Ipak, prema Viglino i suradnici (2006) ne radi se o značajnoj biomagnifikaciji organokositrovih spojeva kroz trofičke razine. Rakovi i ribe sposobniji su enzimima transformirati TBT u DBT i MBT nego školjkaši koji više bioakumuliraju TBT jer nemaju učinkovit sustav razgradnje (Alzieu, 1998). Relativno najveće bioakumulirane koncentracije MBT-a, nešto manje DBT-a i najmanje TBT-a bilježe se i kod puževa što je vjerojatno posljedica metaboličkih procesa (Ide i sur., 1997).

2.2.2. Tributilkositar kao uzročnik imposeksa

Alzieu (2000; originalni rad Alzieu, 1989) navodi masene koncentracije TBT-a u moru koje uzrokuju različite toksične učinke kod morskih organizama: 1) TBT < 1 ng L^{-1} - imposeks

kod puževa, 2) TBT ≈ 1 ng L^{-1} – utjecaj na rast fito i zooplanktona, 3) TBT < 2 ng L^{-1} - anomalije kalcifikacije kod kamenice *Crassostrea gigas*, 4) TBT ≈ 20 ng L^{-1} – ometanje razmnožavanja kamenice *C. gigas*, 5) TBT = 1-10 μg L^{-1} – ometanje razmnožavanja riba, 6) TBT = 1-100 μg L^{-1} – ometanje ponašanja riba. Nadalje navodi da je TBT vrlo toksičan za rakove te da larve jastoga skoro potpuno prestaju rasti kod masene koncentracije TBT-a od 1 μg L^{-1}. Tributilkositar je nesumnjivo glavni uzročnik imposeksa kod neogastropoda (Evans i sur., 2000). Imposeks se kod nekih vrsta javlja već kod masenih koncentracija TBT-a u moru nižih od 1 ng Sn L^{-1} (Bryan i sur., 1987; Gibbs i sur., 1988), dok kod nekih vrsta pri masenoj koncentraciji od 2 ng Sn L^{-1} imposeks doseže stadij steriliteta ženki (Gibbs i sur., 1988; Gibbs, 1996). S rastom masene koncentracije TBT-a u moru, povećava se intenzitet imposeksa (Bryan i sur., 1987; Oehlmann i sur., 1998a; Barroso i sur., 2002). Istraživanja mehanizma pojave imposeksa uslijed djelovanja TBT-a pokazala su da TBT ima svojstvo endokrinog disruptora, dok o samom mehanizmu djelovanja na endokrini sustav postoji nekoliko hipoteza i još uvijek se istražuje (Horiguchi, 2012).

Primjer neogastropoda vrlo osjetljivih na TBT su vrste *Nucella lapillus* (Bryan i sur., 1987; Gibbs i sur., 1988; Oehlmann i sur., 1998a; Barroso i sur., 2000) i *Hexaplex trunculus* (Axiak i sur., 2003; Chiavarini i sur., 2003; Lahbib i sur., 2010a) pa su te vrste pogodne za monitoring TBT-a u manje onečišćenom moru (TBT < 2 ng Sn L^{-1}). Vrsta *T. reticulata* je pogodna za monitoring TBT-a u jače onečišćenom moru (Barroso i sur., 2000; Barreiro i sur., 2001). Među vrstama manje osjetljivim na TBT su vrste *Peringia ulvae* (Pennant, 1777) (Schulte-Oehlmann i sur., 1997), *Littorina littorea* (Bauer i sur., 1995; Oehlmann i sur., 1998a) i *Tritia incrassata* (Oehlmann i sur., 1998a, b). Za razliku od prethodno spomenutih, kod vrste *Neptunea antiqua* (Linneaus, 1758) zabilježeno je da bez obzira na izmjerene visoke masene udjele TBT-a u tkivu, vrsta nije pogođena imposeksom (Ide i sur., 1997). Niske razine organokositrovih spojeva u prirodi teško je određivati kemijskim standardnim tehnikama. Pokazalo se da puževi predstavljaju odlične bioindikatore onečišćenja morskog okoliša tvarima koje uzrokuju imposeks budući da na njih reagiraju već pri vrlo niskim masenim koncentracijama. S obzirom da je granica otkrivanja TBT-a u moru uobičajenim analitičkim metodama oko 1 ng TBT L^{-1} (Oehlmann i sur., 1998a) i da neke vrste puževa imposeksom reagiraju i pri masenim koncentracijama manjim od 1 ng TBT L^{-1} (Alzieu, 2000), monitoring imposeksa kod puževa predstavlja manje skupu i učinkovitu metodu procjene koncentracije TBT-a u morskom okolišu. Ujedno monitoringom se dobija neposredan uvid u toksični učinak TBT-a na istraživanu populaciju.

Stewart i suradnici (1992) navode da su prikladne bioindikatorske vrste one koje se pojavljuju u zoni litorala, imaju veliku rasprostranjenost, brojne su, direktno se razvijaju i imaju ograničenu pokretljivost. Boening (1999) je dao sažet pregled značajki koje bi trebale odlikovati

bioindikatorske organizme za praćenje opterećenosti okoliša ekotoksičnim metalima: tolerancija na široki raspon izloženosti metalima, sposobnost bioakumuliranja metala bez posljedičnog ugibanja, ograničeno i sporo kretanje, život dulji od godine dana, rasprostranjenost u području istraživanja, veličina koja omogućava kemijske analize tkiva, otpornost u smislu preživljavanja uzorkovanja i laboratorijske inkubacije, lakoća uzorkovanja i identifikacije, te reagiranje na promjene izloženosti metalu. Ward (1987) navodi da bi idealna vrsta za biomonitoring onečišćivala u okolišu bila ona koja pokazuje značajnu korelaciju između sadržaja onečišćivala u organizmu i onoga u neposrednom okolišu i ta korelacija trebala bi vrijediti na raznim lokacijama i pod različitim drugim okolišnim uvjetima. Zanimljivo je da je kod vrsta *H. trunculus* i *Stramonita haemastoma* ustanovljena „*in situ*“ pozitivna korelacija između razine organokositrovih spojeva u tkivu jedinki i srednje veličine jedinki što se možda može pojasniti većim somatskim rastom kao posljedicom niže sposobnosti razmnožavanja uslijed uznapredovalog imposeksa (Rilov i sur., 2000).

Starost jedinki koje se uzorkuju također predstavlja značajan čimbenik pri izboru jedinki i tumačenju rezultata istraživanja. Mlađe jedinke su osjetljivije na TBT i brže razvijaju imposeks (Smith, 1981c; Gibbs i sur., 1987, 1988; Oehlmann i sur., 1998b) pa predstavljaju bolji indikator kad je predmet istraživanja relativno nedavna onečišćenost TBT-om. Zbog ireverzibilnosti imposeksa i interseksa za procjenu trenutnog stanja onečišćenosti TBT-om trebale bi se analizirati samo mlade jedinke koje su tek dosegle seksualnu zrelost. Kod odraslih jedinki vrste *L. littorea* intenzitet interseksa nije se povećavao s povećanjem ambijentalnog TBT-a nakon neke vrijednosti, što ukazuje na smanjenu osjetljivost odraslih jedinki (Oehlmann i sur., 1998b). Slično je i s vrstom *Buccinum undatum* Linneaus 1758 (Mensink i sur., 2002).

2.2.3. Zakonska ograničenja korištenja organokositrovih spojeva u protuobraštajnim bojama

Zbog značajnog negativnog utjecaja TBT-a na uzgajanje kamenice *Crassostrea gigas* (Alzieu & Heral, 1984) u Francuskoj je još 1982. godine ograničeno korištenje boja s organokositrovim spojevima. Nakon toga, slične zabrane uvele su Velika Britanija 1987. godine, SAD 1988. godine, Australija i Kanada 1989. godine te Novi Zeland 1993. godine (Alzieu, 1998). Japan je od 1990. godine zabranio korištenje boja s TBT-om kod određenih kategorija brodova (Champ, 2000).

Marine Environmental Protection Committee (MEPC) osnovan od strane *International Maritime Organization* (IMO) izdao je 1990. godine rezoluciju o mjerama za kontrolu štetnih

utjecaja koje TBT u protuobraštajnim bojama može imati na morski okoliš. Najvažnije mjere su: 1) zabrana korištenja protuobraštajnih boja na bazi TBT-a na plovilima kraćim od 25 m, 2) zabrana korištenja protuobraštajnih boja koje imaju stopu otpuštanja TBT-a veću od 4 μg cm^{-2} dan^{-1} 3) uspostava prakse održavanja brodova koja će onemogućiti unošenje TBT-a u morski okoliš prilikom bojanja, čišćenja i sl., 4) stimuliranje razvoja alternativnih protuobraštajnih boja, i 5) monitoring učinkovitosti uvedenih mjera (Champ, 2000). Europska komisija je 1989. godine usvojila amandman 89/677/EZ na Direktivu o ograničenjima na prodaju i korištenje određenih opasnih tvari i pripravaka 76/769/EZ. Među opasnim tvarima koje se navode u amandmanu su i organokositrovi spojevi koji se koriste kao biocidi u protuobraštajnim bojama i čije je korištenje zabranjeno za brodove kraće od 25 m te opremu koja se koristi u marikulturi. Osim toga prodaja protuobraštajnih boja s opasnim tvarima ograničena je na profesionalne korisnike i pakiranja od najmanje 20 l. Direktiva 1999/51/EZ poziva se na IMO rezoluciju o ograničenju korištenja TBT-a. Direktiva o vodama 2000/60/EZ u aneksu VIII prilaže listu glavnih onečišćivala među kojima su i organokositrovi spojevi. Amandmanom 2455/2001/EZ definirana je lista prioritetnih tvari na kojoj se TBT spojevi navode kao prioritetne opasne tvari.

Godine 2001. pod okriljem IMO-a usvojena je međunarodna Konvencija o nadzoru štetnih sustava protiv obraštanja brodova (engl. *International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships*, tzv. AFS konvencija) kojom se zabranjuje korištenje protuobraštajnih boja koje u sebi sadrže organokositrove spojeve od 1.1.2003., s tim da je 1.1.2008. zadan kao krajnji rok do kojeg brodovi na sebi smiju imati protuobraštajne boje s organokositrovim spojevima. Konvencija je za područje EU ozvaničena kroz direktivu 2002/62/EZ i zakon EZ/782/2003. *Environmental Protection Agency* (EPA, 2003) preporučuje maksimalnu dopuštenu masenu koncentraciju za TBT u moru do 0,0074 μg L^{-1} [(2)] kako bi se živi svijet u moru zaštitio od kroničnih posljedica. Granična masena koncentracija TBT-a za zaštitu morskih organizama od akutnih toksičnih posljedica iznosi 0,42 μg L^{-1} [(3)].

Zakonom o potvrđivanju Međunarodne konvencije o nadzoru štetnih sustava protiv obraštanja brodova iz 2001. godine (Narodne novine – Međunarodni ugovori 10/2006) AFS konvencija je potvrđena i u Republici Hrvatskoj. Na Listi opasnih kemikalija čiji je promet zabranjen odnosno ograničen (sada izvan snage verzija iz Narodnih novina 17/2006, na snazi je verzija iz Narodnih novina 39/2010, 20/2011) navode se i organokositrovi spojevi čije se korištenje

[2] Radi se o četverodnevnoj srednjoj vrijednosti koja se ne smije prekoračiti više od jednom u svake tri godine u prosjeku.
[3] Radi se o jednosatnoj srednjoj vrijednosti koja se ne smije prekoračiti više od jednom u svake tri godine u prosjeku.

u svojstvu biocida za sprječavanje rasta mikroorganizama, biljaka i životinja zabranjuje za plovila bez obzira na njihovu dužinu i za opremu koja se koristi u marikulturi. Pravilnikom o uvjetima i načinu održavanja reda u lukama i na ostalim dijelovima unutarnjih morskih voda i teritorijalnog mora RH (Narodne novine 90/2005, 10/2008, 155/2008, 127/2010, 80/2012, 7/2017) zabranjuje se uplovljavanje stranih brodova koji koriste organokositrove spojeve protiv obrastanja u luke Republike Hrvatske. Uredbom o standardu kakvoće voda (Narodne novine 73/2013, 151/2014, 78/2015, 61/2016) najveća dopuštena masena koncentracija tributilkositrovih spojeva kao prioritetnih opasnih tvari ograničena je u kopnenim i drugim površinskim vodama na 0,0015 μg TBT L^{-1}. Prosječna godišnja masena koncentracija ograničena je na 0,0002 μg TBT L^{-1}.

2.3. Stanični biomarkeri onečišćenja okoliša

Biomonitoring omogućava praćenje učinka onečišćivala na živi svijet putem bioindikatorskih vrsta. Vrlo je praktičan kod onečišćivala koja se u niskim koncentracijama zbog ograničenosti postojećih metoda i/ili mjernih instrumenata ne mogu otkriti u morskoj vodi i sedimentu, a uz to omogućava i dobivanje informacija o bioraspoloživosti onečišćivala i biološkoj toleranciji na njih (Carballeira i sur., 2000). Budući da je uz sve prethodno navedeno biomonitoring često financijski povoljniji od klasičnih kemijskih analiza, sve češće je standardni dio programa praćenja stanja okoliša. Cairns (1979) biološki monitoring definira kao "redovno sustavno korištenje organizama za određivanje kvalitete okoliša". Carballeira i suradnici (2000) daju nešto širu definiciju i biomonitoringom nazivaju "svaku tehniku koja omogućava identifikaciju i kvantifikaciju promjena u okolišu bile one prirodne ili uzrokovane djelovanjem čovjeka kroz analizu nekih značajki živog svijeta". Biomonitoring osigurava direktne dokaze promjena koje se događaju u ekosustavu uslijed onečišćenja okoliša (Zhou i sur., 2008), ali i uslijed drugih okolišnih stresova kao što su acidifikacija i eutrofikacija (Markert i sur., 2003). Zhou i suradnici (2008) navode uobičajene tehnike biomonitoringa: bioakumulacija, biokemijske promjene (biokemijski biomarkeri), morfološka praćenja (npr. imposeks), praćenja ponašanja (npr. biotestovi), analize na razini populacije (gustoća, raspodjela veličine) i zajednice (bogatstvo vrsta, sastav zajednice), modeliranje (npr. razvoj modela akumuliranja i otpuštanja teških metala ili predviđanja mogućeg mehanizma metabolizma i toksičnosti onečišćivala).

Biomarkerima se istražuju stanične, biokemijske, molekularne ili fiziološke promjene koje se mjere u stanicama, tjelesnim tekućinama, tkivima ili organima i indikativne su u smislu izloženosti ksenobioticima i/ili učinku ksenobiotika (Lam & Gray, 2003). U užem smislu pojam biomarkera odnosi se na promjene na molekularnoj i staničnoj razini, a njihova je prednost što

predstavljaju vrlo osjetljivo rano upozorenje o integriranom utjecaju onečišćivala na okoliš (Domouhtsidou & Dimitriadis, 2001) budući da se prve promjene na staničnoj razini događaju i otkrivaju već nakon kratkog vremena djelovanja onečišćivala. Promjene na substaničnoj razini mogu konvergirati u oštećenja ne samo organizma, već i populacije i šire zajednice kad je već teže ograničiti opseg oštećenja (UNEP/RAMOGE, 1999). Djelovanje onečišćivala očituje se ili kroz duljinu izloženosti ili kroz dozu izloženosti ili oboje (Lam & Gray, 2003). Na tragu prethodno iznesenog, biomarkeri mogu biti biomarkeri izloženosti ili biomarkeri učinka. Lam i Gray (2001) navode da bi se biomarkeri izloženosti trebali koristiti u početnim fazama otkrivanja potencijalnih okolišnih problema budući da je izloženost neophodna, ali ne i dovoljna za učinak. Isti autori (Lam & Gray, 2003) smatraju da bi tzv. biomarkeri općeg stresa uz biotestove trebali biti dio prve faze monitoringa, zajedno sa standardnim kemijskim i fizikalno-kemijskim analizama morskog okoliša te analizom bentoskih zajednica. U slučaju da multivarijantna analiza bentoske zajednice ukaže na postojanje uzročnika izmijenjenog stanja, u drugoj fazi monitoringa trebalo bi primijeniti biomarkere izloženosti. Nadalje, kod rezultata kemijskih analiza većih od referentnih, u drugoj fazi monitoringa trebalo bi primijeniti i biomarkere učinka. Pozitivni rezultati biotestova trebali bi biti povod za provedbu dodatnih analiza specifičnih onečišćivala, a u slučaju povećanih razina trebalo bi koristiti specifične biomarkere (npr. za genotoksičnost/mutagenost, endokrini poremećaj). U nastavku se daje kratak pregled biomarkera općeg stresa koji su od interesa za predmetno istraživanje.

Uslijed izloženosti organizma stresnim situacijama kao što su promjena temperature, promjena koncentracije kisika u okolišu, ali i izloženosti mnogim ksenobioticima, u stanicama dolazi do oksidacijskog stresa koji je rezultat prekomjernog stvaranja reaktivnih oksidativnih vrsta (engl. *reactive oxigen species*, ROS) (Štambuk, 2011). Atom kisika, vodikov peroskid, hidroksilni radikal i superoskidni radikal čine najznačajnije ROS-e. Prije nego što se pojave vidljivi simptomi oksidacijskog stresa, u stanicama prorade sustavi za zaštitu od povišene količine ROS-a. Radi se o neenzimskim antioksidansima i antioksidacijskim enzimima koji se mogu izmjeriti spektrofotometrijski u proteinskim ekstraktima tkiva (Štambuk, 2011). Prema Halliwell & Gutteridge (1999) antioksidansi su „tvari koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksidira, značajno usporavaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata“. Dijele se na preventivne, koji sprječavaju stvaranje novih radikala, „čistače“, koji neutraliziraju već stvorene radikale, te „reparacijske“, koji obnavljaju biomolekule oštećene u uvjetima oksidativnog stresa (Štambuk, 2011).

Biomarkere koji pripadaju skupini neenzimskih antioksidansa čine: 1) glutation (GSH) koji je tripeptid i djeluje kao disulfidni reducens za zaštitu tiolnih grupa enzima i regenerira

antioksidans askorbat u askorbat - glutationskom ciklusu, 2) glutation S-tranferaza (GST) koja je najzastupljeniji enzim faze II biotransformacije, i 3) glutation reduktaza (GR) koja regenerira glutation.

1) GSH može detoksicirati toksikante konjugacijom bilo spontano, bilo aktivnošću GST. GSH oksidira s atomnim kisikom i hidroksilnim radikalima u glutation disulfid, GSSG koji je prilično toksičan za stanice. Omjer reduciranog glutationa GSH i oksidiranog glutationa GSSG obično se održava vrlo visokim kao rezultat aktivnosti enzima GR (Young & Woodside, 2001):

   $GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$

2) GST katalizira početni korak sinteze merkapturne kiseline i konjugaciju glutationa s elektrofilnim ksenobioticima te njihovim metabolitima (George, 1994; Fitzpatrick i sur., 1995).
3) GR katalizira redukciju GSSG u GSH. Glutation reduktaza ima esencijalnu ulogu u sprječavanju oksidacijskih oštećenja unutar stanice iako tek na indirektan način sudjeluje u održavanju razine unutarstaničnog glutationa (GSH).

Biomarkeri koji pripadaju skupini antioksidacijskih enzima koji razgrađuju manje aktivne oblike kisikovih radikala u neaktivne molekule su: 4) superoksid dismutaza (SOD), 5) katalaza (CAT), 6) nespecifične peroksidaze, i 7) glutation peroksidaza (GPx).

4) SOD je metaloenzim koji katalizira dismutaciju superoksida čime umjesto vrlo toksičnog radikala $HO\cdot$ nastaju vodikov peroksid i kisik (Young & Woodside, 2001):

   $2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

   H_2O_2 se nakon toga detoksificira pomoću CAT i GPx. Smatra se da SOD ima središnju antioksidacijsku ulogu.
5) CAT je hematin – sadržavajući enzim koji katalizira dvostupanjsku konverziju vodikovog peroksida u vodu i kisik štiteći tako stanicu od vodikovog peroksida (Young & Woodside, 2001):

   $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

6) GPx je enzim koji u svojoj strukturi sadrži selen i koji katalizira oksidaciju glutationa GSH nauštrb hidroperoksida koji može biti vodikov peroksid ili npr. lipidni hidroperoksid (Young & Woodside, 2001):

   $ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + H_2O + ROH$

   GSSG (glutation disulfid) se zatim reducira nazad do GSH pomoću glutation reduktaze uz utrošak NADPH.

Nakon što nastupi stanje oksidativnog stresa može doći do oštećenja staničnih makromolekula što se može istražiti sljedećim biomarkerima: 7) karbonili koji ukazuju na oštećenje proteina, i 8) malondialdehidi (MDA) koji ukazuju na lipidnu peroksidaciju odnosno promjene u fizičkim značajkama stanične membrane i njezinim funkcijama (Štambuk, 2011).

7) Karbonilne (CO) grupe (aldehidi i ketoni) nastaju na bočnim lancima proteina kada se oni oksidiraju (Dalle-Donne i sur., 2003). Povišene razine karbonilnih grupa znak su ne samo oksidativnog stresa već i disfunkcije proteina zbog nastalih trajnih modifikacija proteina uslijed karbonilacije. S obzirom da karbonilne grupe nastaju prilično rano u odnosu na oksidativni stres i da su oksidirani proteini relativno stabilni, CO predstavljaju vrlo pogodan biomarker u odnosu na neke druge (Dalle-Donne i sur., 2003).
8) MDA je glavni produkt lipidne peroksidacije (Del Rio i sur., 2005). Lipidna peroksidacija rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekulske strukture, a posljedica je oksidativnog stresa. Lipidnu peroksidaciju najčešće započinje hidroksilni radikal sposoban da izdvoji atom vodika iz metilenske skupine polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i započne peroksidacijski niz u lipidnim sustavima (Dora i sur., 2012). MDA može imati daljnje štetne učinke na stanice i tkiva stvarajući oštećenja DNA i staničnih proteina (Laureatti i sur., 1998).
9) Enzim acetilkolinesteraza (AChE) predstavlja specifični biomarker izloženosti specifičnim onečišćivalima. AChE je enzim bitan za ispravan prijenos živčanih impulsa. Inhibicija ovog enzima smatra se biomarkerom izloženosti organifosfatima i karbamatima (Bocquené & Galgani, 1991), ali i drugim onečišćivalima uključivo teškim metalima (Payne i sur., 1996; Elumalai i sur., 2002).

U sklopu dosadašnjih istraživanja imposeksa na području Jadrana nisu istraživani stanični biomarkeri. Onečišćenje Jadrana istraživano je korištenjem biomarkera na staničnoj razini najčešće korištenjem dagnje *Mytilus galloprovincialis* kao bioindikatorske vrste (npr. Batel & Zvonarić, 2002; Jakšić, 2002; Petrović i sur., 2004; Štambuk, 2011; Štambuk i sur., 2013). Pokazalo se da biokemijski odgovori vrste *Hexaplex trunculus* predstavljeni acetilkolinesterazom, katalazom i glutation S-transferazom mogu poslužiti kao biomarkeri izloženosti na onečišćenje kadmijem, bakrom, karbofuranom i lindanom (Roméo i sur., 2006). Mahmoud i suradnici (2012) potvrdili su da biokemijski odgovori na onečišćenje kadmijem i permetrinom predstavljeni katalazom mogu poslužiti kao biomarkeri izloženosti.

2.4. Volak *Hexaplex trunculus*

Volak *Hexaplex trunculus* predstavlja jednu od najrasprostranjenijih vrsta puževa na području Sredozemlja (Gofas i sur., 2001). Rasprostranjenosti ove vrste pogoduje činjenica da naseljava raznolika morska dna, kako stjenovita tako i pjeskovita te muljevita, do 100 m dubine (Terlizzi i sur., 1998). Izbjegava područja koja su izložena valovima pa naseljava ili plitka zaklonjena područja ili dublje more (Rilov i sur., 2004). Ipak, najbrojnije populacije nalaze se u blizini uzgajališta školjkaša (Zavodnik & Šimunović, 1997), budući da se radi o predatorskoj vrsti (Peharda & Morton, 2006). Volak se od davnih vremena lovi kao sirovina za proizvodnju purpurne boje, kao mamac za ribu, ali i kao hrana za čovjeka. Volak je predator, strvinar i kanibal (Rilov i sur., 2004; Peharda & Morton, 2006; Lahbib i sur., 2010b). Peharda i Morton (2006) navode da je ovaj oportunistički predator sposoban napasti gotovo sve beskralježnjačke vrste u potrazi za hranom. Tijekom godine volak prosječne veličine 55 mm može konzumirati oko 18 školjkaša vrste *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Peharda & Morton, 2006).

Volak *H. trunculus* smatra se vrstom kratkog do srednjeg životnog vijeka. Vasconcelos i suradnici (2006b) navode da je životni vijek volka oko 10 godina te da je u dobi od 3 godine duljina kućice volka oko 60 mm. Istraživanje koje su proveli na jedinkama volka iz područja južnog Portugala pokazuje da je brzina rasta volka 1,0 mm mjesečno duljina kućice, 2,0 mm mjesečno opseg kućice i ukupna masa 0,7 g mjesečno, pri čemu starije jedinke rastu sporije od mlađih. Maksimalna duljina koju dosegnu je 80 do 90 mm, a zabilježena je i duljina od 108 mm (Vasconcelos i sur., 2007). Mriještenje volaka u južnom Portugalu odvija se uglavnom u razdoblju svibanj-lipanj što je vjerojatno posljedica rasta temperature mora tijekom proljeća, no potom se javlja još jedno mriještenje u razdoblju listopad-studeni (Vasconcelos i sur., 2008). Slično istraživanje su proveli i Lahbib i suradnici (2010b) te zabilježili prosječnu duljinu jedinki u vrijednosti 36,30±6,21 mm nakon 31 mjeseca odrastanja u laboratorijski kontroliranim uvjetima te spolnu zrelost samo kod jednog mužjaka duljine 47,30 mm. Općenito, mužjaci volka uglavnom dominiraju među manjim jedinkama, a ženke među većim (Tirado i sur., 2002; Vasconcelos i sur., 2008).

Ova vrsta se od 1995. godine koristi kao bioindikatorska vrsta u istraživanjima onečišćenja morskog okoliša organokositrovim spojevima, u prvom redu TBT-om (Axiak i sur., 1995; Terlizzi i sur., 1998, 1999; Axiak i sur., 2000; Rilov i sur., 2000; Axiak i sur., 2003; Chiavarini i sur., 2003; Pelizzato i sur., 2004; Terlizzi i sur., 2004; Prime i sur., 2006; Vasconcelos i sur., 2006a; Garaventa i sur., 2007; Stagličić i sur., 2008; Lahbib i sur., 2009a, 2010a; Noventa, 2010; Anastasiou i sur., 2015; Carić i sur., 2016). S obzirom da je *H. trunculus* vrsta koja nema planktonsku larvalnu fazu,

ograničenog je radijusa kretanja i nizom istraživanja je utvrđena korelacija između sadržaja TBT-a u tkivu volka i u morskom okolišu, na temelju kriterija koje bi trebale zadovoljiti bioindikatorske vrste (Ward, 1987; Boening, 1999) može se zaključiti da se radi o vrsti koja je pogodan bioindikator onečišćenja morskog okoliša TBT-om.

Tributilkositar u vodene organizme kod organizama više trofičke razine može dospjeti i putem prehrane (Hoch, 2001). U istraživanju prehrambenih lanaca u novije vrijeme uobičajene su analize stabilnih izotopa. Tumačenje stabilnih izotopa zasniva se na "zapisu" izotopnog sastava različitih pljenova iz predatorove prehrane u predatorovom tkivu (Boecklen i sur., 2011). Izotopi ugljika $^{13}C/^{12}C$ pružaju informacije o izvoru i povijesti prehrane odnosno o značajkama povijesti života, a izotopi dušika $^{15}N/^{14}N$ o trofičkoj razini istraživane vrste odnosno strategiji životinje (Michener & Kaufman, 2007). Stabilni izotopi dušika i ugljika kod vrste *Hexaplex trunculus* istraživani su u sklopu istraživanja hranidbenih lanaca kojima pripada ova vrsta (Marín-Guirao i sur., 2008; Deudero i sur. 2011). Eventualna povezanost stabilnih izotopa kod vrste *H. trunculus* i onečišćenosti morskog okoliša na području Jadrana, odnosno povezanosti stabilnih izotopa i imposeksa do sada nisu istraživani.

2.5. Rasprostranjenost imposeksa i onečišćenost mora organokositrovim spojevima

Nakon uvođenja ograničenja u korištenju TBT-a u protuobraštajnim premazima tijekom osamdesetih i devedesetih godina dvadesetog stoljeća problem imposeksa na području Europske unije uglavnom se zadržao u lukama (Evans, 1995; Evans i sur., 1996; Rees i sur., 2001) i na stalnim rutama komercijalnih i velikih ribarskih brodova (Ruiz, 1998). Također došlo je do znatnog poboljšanja stanja u zaljevu Arcachon u Francuskoj u kojem se uzgajaju kamenice (Alzieu, 1998). Totalnom zabranom korištenja TBT-a došlo je do oporavka mnogih populacija puževa uključujući vrste *Nucella lapillus*, *Tritia reticulata*, *Nassarius nitidus* i *Stramonita haemastoma* koje su u prethodnim istraživanjima bile ozbiljno pogođene imposeksom na lokacijama Sjevernog mora, obalama Engleske, atlantskim obalama Francuske i Španjolske i sjeverozapadnoj obali Portugala (Evans i sur., 1996; Birchenough i sur., 2002; Huet i sur., 2004; Bray i sur., 2011; Cuevas i sur., 2014; Langston i sur., 2015; Laranjeiro i sur., 2015; Nicolaus & Barry, 2015).

Međutim, zabilježena su i istraživanja prema kojima su koristi od uvedenih zabrana minimalne. Jedno od takvih je i istraživanje imposeksa i TBT-a provedeno za vrstu *N. lapillus* uz portugalsku obalu prema kojem nije došlo do značajnog oporavka populacija (Barroso & Moreira, 2002). Prisutan, ali nešto manje izražen nego u Sredozemlju, imposeks je zabilježen kod vrste

Hexaplex trunculus u južnom Portugalu (Vasconcelos i sur., 2006a). Rato i suradnici (2008) nailaze u Portugalu na ženke vrste *T. reticulata* ozbiljno pogođene imposeksom ne samo u estuarijima gdje su smještena brodogradilišta, već i u području susjednog kontinentalnog šelfa. Galante-Oliveira i suradnici (2009) iako uočavaju pad pojave imposeksa kod vrste *N. lapillus* u području sjeverozapadnog Portugala u razdoblju 1997-2007. godine, još uvijek bilježe unos TBT-a u morski okoliš što je vidljivo iz masenog udjela organokositrovih spojeva u tkivu puževa. Guðmundsdóttir i suradnici (2011) također bilježe rast pojave imposeksa u blizini nekoliko manjih luka na Islandu. Značajne masene koncentracije TBT-a u moru, koje su vjerojatno povezane s resuspenzijom onečišćenog sedimenta, bilježe se i u Engleskom kanalu (Langston i sur., 2015) i Baltičkom moru (Suzdalev i sur., 2015).

U ostatku svijeta tijekom zadnjih desetak godina mnoga istraživanja imposeksa povezanog s TBT-om ipak i dalje pokazuju prisutnost imposeksa. Shi i suradnici (2005) su utvrdili imposeks kod 30 vrsta puževa u vodama Kine. Camillo i suradnici (2004) su zabilježili prisutnost imposeksa kod vrste *Thais rustica* (Lamark, 1822) u Brazilu, Marshall i Rajkumar (2003) kod vrste *Nassarius kraussanius* (Dunker, 1846) u Južnoj Africi, a Castro i suradnici (2007) kod vrste *S. haemastoma* u južnom Brazilu. Swennen i suradnici (2009) su uočili znatno povećanje imposeksa kod puževa u Tajlandskom zaljevu u razdoblju 1996-2006. godine, gdje još uvijek nije bila uvedena zabrana korištenja organokositrovih spojeva. Kim i suradnici (2014) tijekom 2009. i 2010. godine u Južnoj Koreji bilježe značajne masene koncentracije TBT-a u moru. Treba ipak naglasiti da se i u ostatku svijeta bilježe slučajevi oporavka populacija puževa koje su ranije bile ozbiljno pogođene imposeksom kao npr. na južnim obalama Brazila (Castro i sur., 2012).

Istraživanja imposeksa u Sredozemlju počela su s Axiakom i suradnicima (1995) koji su imposeks kod vrste *Hexaplex trunculus* istraživali u području Malte. U istočnom Sredozemlju (Izrael) potvrđena je povezanost imposeksa i TBT-a na vrstama *Stramonita haemastoma* i *H. trunculus* (Rilov i sur., 2000). Značajna korelacija između stadija imposeksa i masenog udjela TBT-a u tkivu kod vrste *H. trunculus* potvrđena je i u području Sicilije (Chiavarini i sur., 2003). Imposeks kod vrste *H. trunculus* bilježi se na svim istraživanim lokacijama u vodama Malte pa čak i na onima kojima se brodovi kreću vrlo rijetko (Axiak i sur., 2003). Slično je i sa zaštićenim morskim područjima Italije gdje je imposeks zabilježen kod svih istraživanih jedinki vrste *H. trunculus* (Terlizzi i sur., 2004). Istraživanja provedena u Tunisu na vrsti *H. trunculus* tijekom 2004. i 2007. godine pokazuju blago smanjenje pojave imposeksa u trogodišnjem razdoblju, a na nekim lokacijama zabilježene su populacije koje nisu zahvaćene imposeksom (Lahbib i sur., 2009a). Svakako imposeks se i dalje bilježi kod sredozemnih populacija što pokazuju novija

istraživanja provedena na Sardiniji i u Tunisu (Abidli i sur., 2013; Anastasiou i sur., 2015; Boulajfene i sur., 2015).

Vrste puževa na kojima je istraživan imposeks u Sredozemlju i koje su se pokazale kao dobri bioindikatori onečišćenja TBT-om su *H. trunculus*, *S. haemastoma* te *Bolinus brandaris* (Linnaeus, 1758) (Axiak i sur., 1995, 2000, 2003; Solé i sur., 1998; Terlizzi i sur., 1998, 1999, 2004; Rilov i sur., 2000; Ramon i Amor, 2001; Chiavarini i sur., 2003; Prime i sur., 2006; Garaventa i sur., 2006a, 2007; Lahbib i sur., 2009a; 2010a; Abidli i sur., 2011, 2013; Elhasni i sur., 2013). Novija istraživanja provodila su se i na vrstama *Tritia mutabilis* (Linnaeus, 1758), *Conus ventricosus* Gmelin, 1791 i *Tritia neritea* (Linnaeus, 1758) (Lahbib i sur., 2010a, 2013).

Prvo istraživanje imposeksa u Jadranskom moru obavljeno je u razdoblju 1995-1996. godine uz talijansku obalu, područje Brindisi, na vrsti *H. trunculus* (Terlizzi i sur., 1998). U području Brindisija sve istraživane ženke bile su zahvaćena imposeksom, a 26% ženki je bilo sterilno. Pelizzato i suradnici (2004) i Garaventa i suradnici (2006a, 2007) istraživali su imposeks kod vrste *H. trunculus* u području Venecije u razdoblju 2002-2003. godine pri čemu je zadnje istraživanje uključivalo i obalno područje zapadne Istre. Prime i suradnici (2006) predstavljaju prvo istraživanje imposeksa provedeno tijekom 2005. godine u hrvatskom srednjem dijelu Jadrana na vrsti *H. trunculus*. Istraženo je 12 postaja kategoriziranih u jednu od četiri kategorije ovisno o brodskim aktivnostima: nautičke marine, lučice, uvale koje se sezonski koriste i referentna područja. I ovo je istraživanje ukazalo na prisutnost imposeksa u populacijama na svim istraživanim postajama, kako u marinama, tako i u referentnim područjima. Istraživanje provedeno u području Kaštelanskog zaljeva tijekom 2004. i 2006. godine pokazalo je da su sve ženke bile zahvaćene imposeksom (Stagličić i sur., 2008). Vrsta *H. trunculus* zahvaćena je imposeksom i na području Venecije (Pelizzato i sur., 2004; Garaventa i sur., 2007; Noventa, 2010) i zapadne Istre (Garaventa i sur., 2007). Prema rezultatima istraživanja koje su proveli Carić i suradnici (2016) imposeks je tijekom 2006. godine bio prisutan i kod svih istraživanih populacija volaka sakupljenih u dubrovačkom području.

Dio prethodno spomenutih istraživanja uključuje i istraživanje prisutnosti organokositrovih spojeva, najčešće u tkivu bioindikatorske vrste, a rjeđe i u sedimentu istraživanih lokacija. Dosadašnja istraživanja imposeksa provedena u hrvatskom dijelu Jadrana nisu uključivala istraživanja prisutnosti organokositrovih spojeva. Onečišćenje morskog okoliša organokositrovim spojevima u hrvatskom dijelu Jadrana istraživali su Furdek i suradnici (2012, 2016) i Furdek (2015). Istraživanja su provedena tijekom 2009., 2010., 2011. i 2013. godine u hrvatskom Jadranu, od zapadne Istre do dubrovačkog područja, na ukupno 72 postaje i to na uzorcima sedimenta, morske vode i tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Onečišćenje butilkositrovim spojevima

zabilježeno je na svim istraživanim lokacijama pri čemu su najveća onečišćenja zabilježena u područjima intenzivnog brodskog prometa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje i dinamika istraživanja

Terensko istraživanje je vremenski i prostorno bilo podijeljeno u dva dijela. Prvi dio istraživanja proveden tijekom travnja i svibnja 2014. godine i tom prilikom prikupljene su jedinke volka *Hexaplex trunculus* u svrhu istraživanja prisutnosti imposeksa, povezanosti imposeksa s butilkositrovim spojevima u tkivu volka, te povezanosti imposeksa s drugim biomarkerima. Jedinke su uzorkovane na 7 odabranih postaja na širem splitskom području i na lokaciji Mali Ston. Postaje uzorkovanja su kategorizirane u dvije skupine, ovisno o intenzitetu brodskog prometa koji se na njima odvija (Slika 3.1.1):

1) postaje s intenzivnijim brodskim aktivnostima (A; onečišćene): Split-trajektna luka (A1), Vranjic (A2), Trogir-marina (A3), Split-marina Spinut (A4);
2) postaje sa slabijim intenzitetom brodskih aktivnosti (N; referentne): Mali Ston (N1), Marina-uzgajalište (N2), Čiovo (N3).

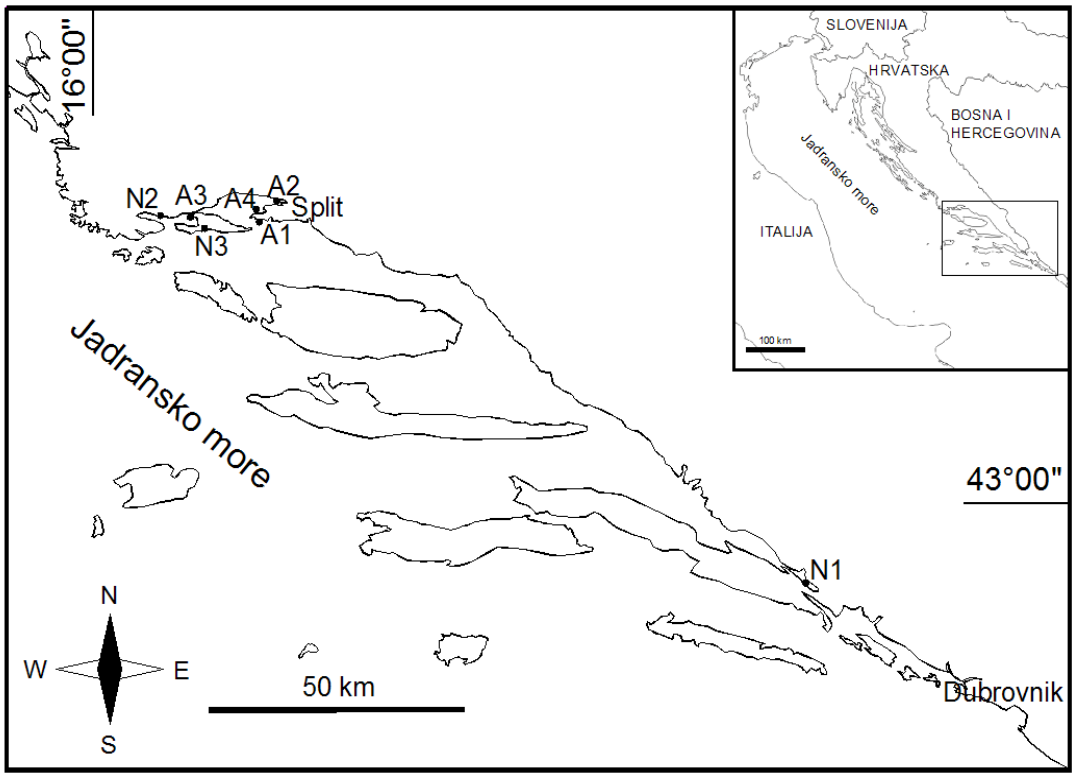
Drugi dio istraživanja za cilj je imao usporediti učestalost i razvoj pojave imposeksa u jedinkama vrste *H. trunculus* u 2005. i 2015. godini te utvrditi ovisnost razvoja imposeksa o masenom udjelu butilkositrovih spojeva u tkivu volka i sedimentu, kao i utvrditi razine stabilnih izotopa ugljika i dušika u mišićnom tkivu volka. U tu svrhu jedinke vrste *H. trunculus* i površinski sediment prikupljeni su tijekom svibnja i lipnja 2015. godine na 12 postaja od Zadra do Dubrovnika koje su bile istovjetne onima iz istraživanja koje su 2005. godine proveli Prime i suradnici (2006). Postaje uzorkovanja su, ovisno o intenzitetu brodskog prometa, kategorizirane u četiri skupine (Slika 3.1.2):

1) nautičke marine (M): Marina (M1), Milna (M2), Biograd (M3);
2) lučice (H): Baška Voda (H1), Rogač (H2), Vis (H3);
3) uvale koje se koriste samo sezonski (B): Zaton (B1), Lastovo (B2), Crvena Luka (B3);
4) referentne postaje koje se koriste vrlo rijetko (P): Brsečine (P1), Drage (P2), Mali Ston (P3).

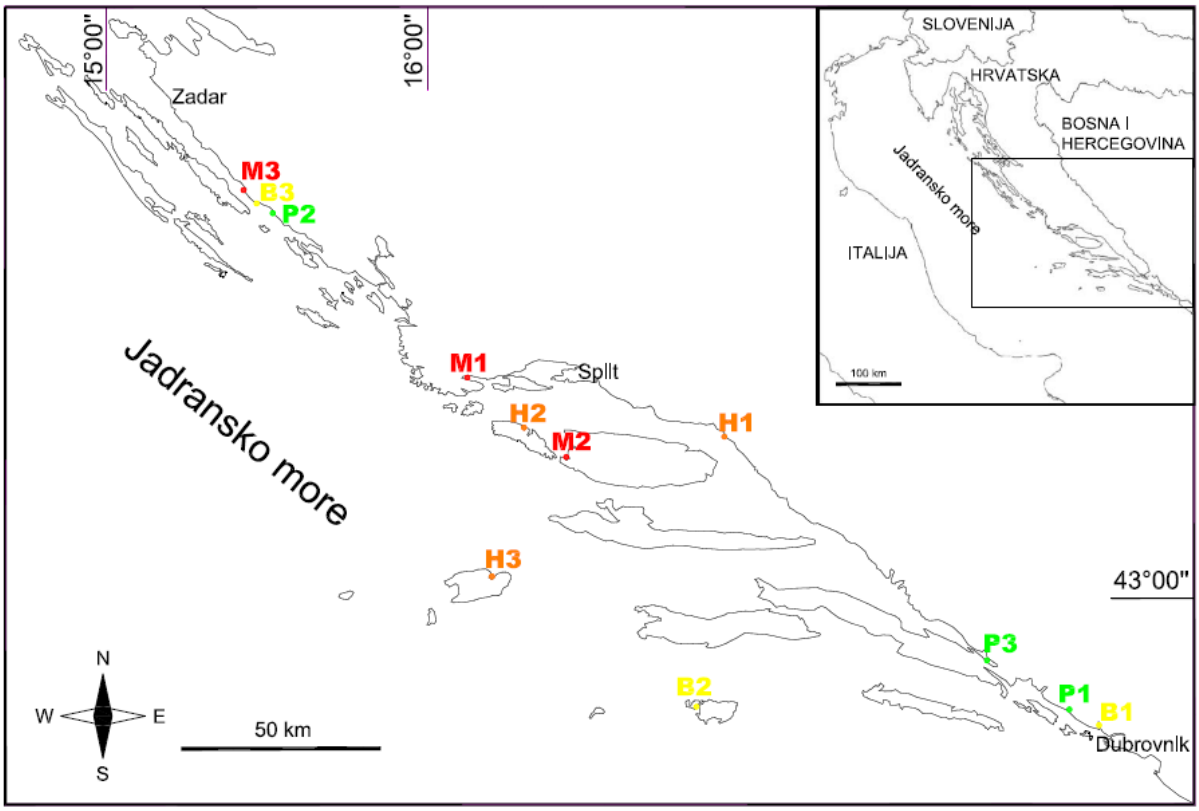
Jedinke volaka i uzorci sedimenta prikupljeni su ronjenjem na dah i upotrebom autonomnog ronilačkog aparata na dubini 1-10 m. Na svakoj od postaja uzorkovano je oko 60 odraslih jedinki čija je veličina kućice bila veća od 40 mm. Budući da je životni vijek volka oko 10 godina, a u dobi od 3 godine kućica volka naraste na 60 mm (Vasconcelos i sur., 2006b), jedinke veće od 40 mm smatraju se pogodnim za ocjenu stanja onečišćenja morskog okoliša tijekom

razdoblja duljeg od jedne godine. Sa svake postaje prikupljen je po jedan uzorak površinskog sedimenta.

Uzorkovane jedinke i sediment su neposredno nakon uzorkovanja prevezeni u Laboratorij za ribarstvenu biologiju, gospodarenje pridnenim i pelagičkim naseljima Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Jedinke su do mjerenja morfometrijskih obilježja i određivanja stadija imposeksa čuvane u posudama s morskom vodom uz ozračivanje najduže 48 h. Sediment je do daljnje obrade spremljen na temperaturu -20°C.



Slika 3.1.1. Postaje uzorkovanja jedinki *Hexaplex trunculus* u razdoblju travanj-svibanj 2014. godine (A1 = Split-trajektna luka, A2 = Vranjic, A3 = Trogir-marina, A4 = Split-marina Spinut, N1 = Mali Ston, N2 = Marina-uzgajalište, N3 = Čiovo)



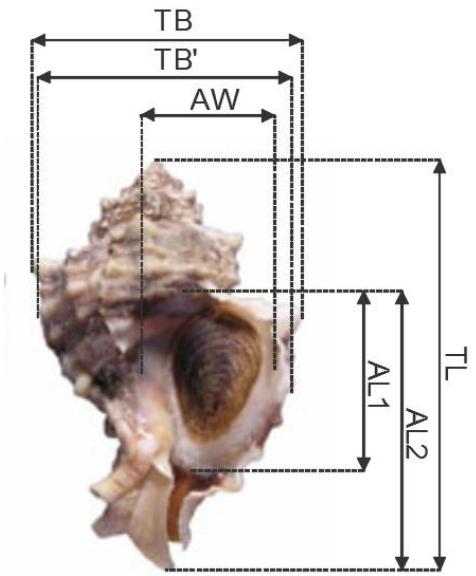
Slika 3.1.2. Postaje uzorkovanja jedinki *Hexaplex trunculus* i sedimenta u razdoblju svibanj-lipanj 2015. godine (M1 = Marina, M2 = Milna, M3 = Biograd, H1 = Baška Voda, H2 = Rogač, H3 = Vis, B1 = Zaton, B2 = Lastovo, B3 = Crvena Luka, P1 = Brsečine, P2 = Drage, P3 = Mali Ston).

3.2. Biološke analize

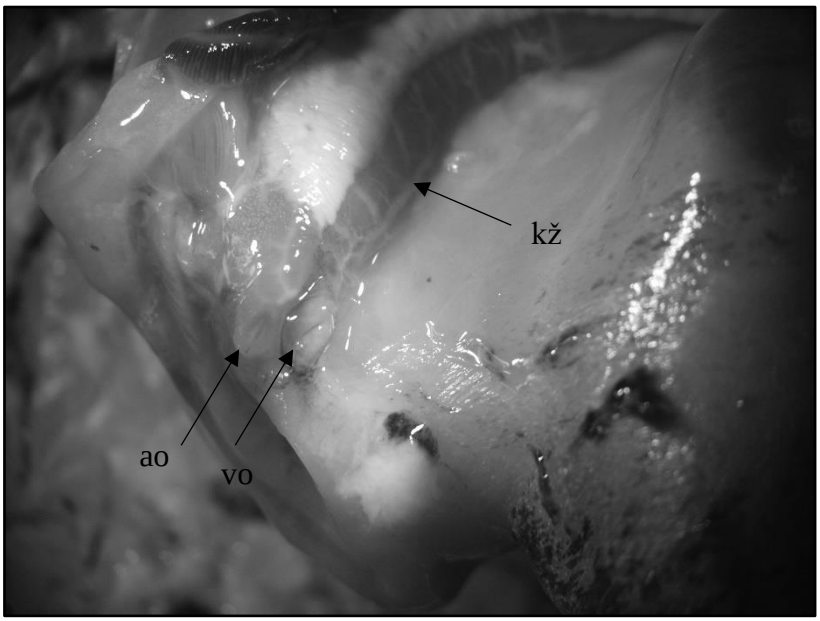
3.2.1. Morfometrijska obilježja, gonadosomatski i indeks kondicije

U Laboratoriju za ribarstvenu biologiju, gospodarenje pridnenim i pelagičkim naseljima Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, izmjerena su morfometrijska obilježja kućice volka korištenjem pomične mjerke preciznosti 0,1 mm: duljina kućice (TL), širine kućice (TB i TB'), širina otvora kućice (AW), visine otvora kućice (AL1 i AL2). Grafički prikaz izmjerenih morfometrijskih obilježja prikazan je na Slici 3.2.1. Na digitalnoj vagi izvagana je masa svake jedinke s kućicom (TM). Nakon pažljivog razbijanja kućice čekićem izvagana je ukupna masa mekog tkiva (WM), masa kućice (SM), masa gonada i hepatopankreasa (GHM) i masa ostatka mekog tkiva (OM). Masa je mjerena preciznošću od 0,1 g. Nakon vaganja, uklonjen je operkulum i napravljen longitudinalni rez volka duž hipobranhijalne žlijezde kako bi se odredio spol i stadij imposeksa kod ženki. Mužjaci su prepoznati po penisu smještenom iza desnog očnog tentakula, sjemenovodu te odsutnosti kapsularne žlijezde i vaginalnog otvora. Ženke su prepoznate po

prisutnosti vaginalnog otvora i kapsularne žlijezde (Slika 3.2.2.), (Axiak i sur., 1995; Chiavarini i sur., 2003). Raspoznavanju spolova doprinijela je i boja gonada volka budući da je boja gonada mužjaka smeđa do siva, najčešće boje senfa, a kod ženki je svjetlija, žuta do narančasta (Jelić, 2007).



Slika 3.2.1. Prikaz morfometrijskih obilježja mjerenih na volku *Hexaplex trunculus* (TB i TB' – širine kućice, AW – širina otvora kućice, TL – duljina kućice, AL1 i AL2 – visine otvora kućice)



Slika 3.2.2. Prepoznavanje ženke volka *Hexaplex trunculus* zbog prisutnosti kapsularne žlijezde (kž) i vaginalnog otvora (vo) uz analni otvor (ao)

Formule za izračun indeksa kondicije i gonadosomatskog indeksa za logaritamski standardizirane podatke su:

CI 1 = log (ukupna masa mekog tkiva)/log (duljina kućice)

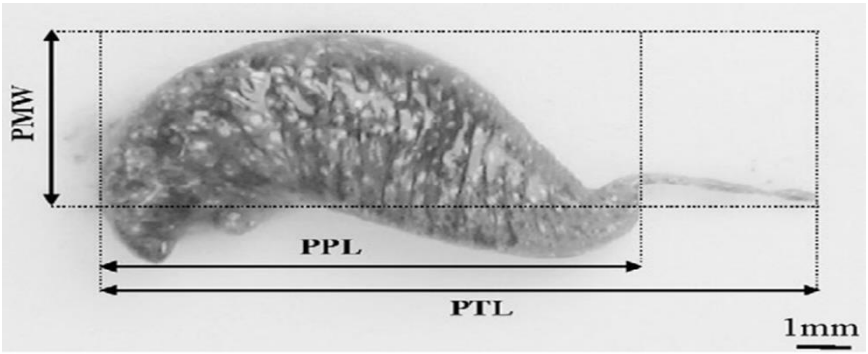
CI 2 = log (masa ostatka mekog tkiva)/log (duljina kućice)

CI 3 = log (masa kućice)/log (duljina kućice)

GSI = log (masa gonada i hepatopankreasa)/log (duljina kućice)

3.2.2. Imposeks

Svakoj jedinki izmjerena je duljina penisa od njegovog vrha do mjesta spajanja s tijelom korištenjem pomične mjerke s preciznošću od 0,1 mm. Budući da je penis najčešće uvijen, za potrebe mjerenja je izravnat i izmjerene su ukupna duljina (PTL), duljina bez tanjeg dijela (PPL) i širina penisa (PMW), sve kako je prikazano na Slici 3.2.3.



Slika 3.2.3. Prikaz dimenzija penisa (PTL – ukupna duljina penisa, PPL – duljina penisa bez tanjeg dijela, PMW – širina penisa) mjerenih na volku *Hexaplex trunculus* (prema Vasconcelos i sur., 2006c)

Za svaku od istraživanih populacija izračunata su tri indeksa imposeksa: indeks relativne veličine penisa, indeks relativne duljine penisa i vas deferens indeks. Izrazi za izračun ovih indeksa su dani u nastavku.

Indeks relativne veličine penisa (RPSI, eng. *Relative Penis Size Index*):

RPSI = ((prosječna duljina ženskog penisa)^3/(prosječna duljina muškog penisa^3)) x 100, prema Gibbs i suradnici (1987);

Indeks relativne duljine penisa (RPLI, eng. *Relative Penis Lenght Index*):

RPLI = ((prosječna duljina ženskog penisa)/(prosječna duljina muškog penisa)) x 100, prema Stroben i suradnici (1992);

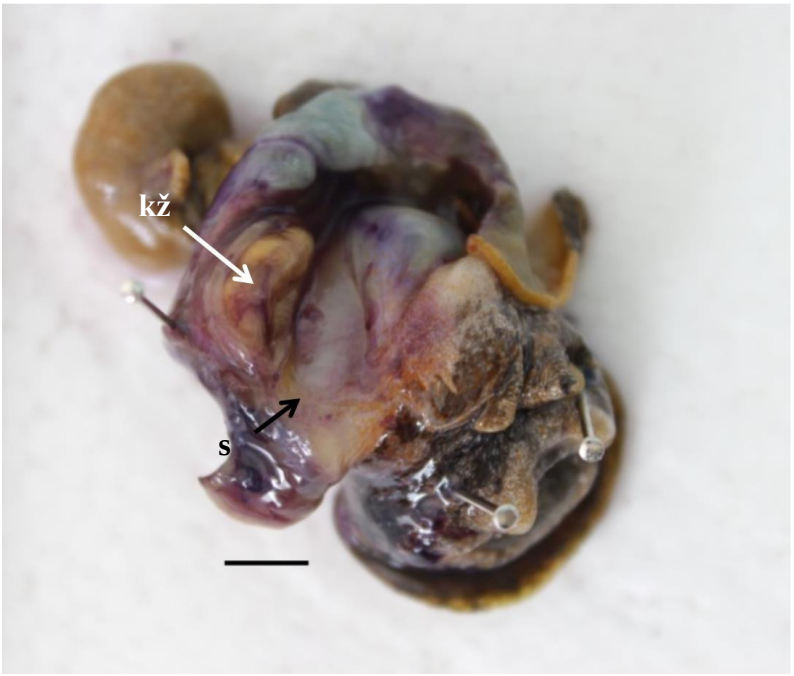
Indeks vas deferensa (VDSI, eng. *Vas Deferens Sequence Index*):

VDSI = (suma vrijednosti stadija imposeksa svih ženki)/(broj ženki u istraživanoj populaciji), prema pristupu opisanom u radovima Gibbs i suradnika (1987) i Stroben i suradnika (1992), te dopunjenom za vrstu *H. trunculus* od strane Axiak i suradnika (1995) i Terlizzi i suradnika (1999).

Stadiji imposeksa koji se koriste za izračun indeksa VDSI međusobno se razlikuju ovisno o prisutnosti penisa i duljini sjemenovoda (Tablica 3.2.1).

Tablica 3.2.1. Stadiji imposeksa kod vrste *Hexaplex trunculus* prema Axiak i suradnici (1995), dopunjeno s Terlizzi i suradnici (1999)

Oznaka stadija imposeksa	**Opis stadija imposeksa**
0	ženke bez muških spolnih obilježja
1	javljaju se prvi znakovi imposeksa u vidu ispupčenja iza desne očne tentakule koje predstavlja početni penis
2	prisutan mali penis, početak razvoja sjemenovoda (vas deferensa)
3	penis je veći nego u stadiju 2, sjemenovod je duži nego u stadiju 2
4	sjemenovod doseže vaginalni otvor, veličina penisa je usporediva s veličinom penisa kod mužjaka istog razreda veličine
4,3	sjemenovod prolazi vaginalni otvor, veličina penisa je usporediva s veličinom penisa kod mužjaka istog razreda veličine
4,7	sjemenovod zadire u kapsularnu žlijezdu, vaginalni otvor je nepromijenjen, kopulacija je i dalje moguća, veličina penisa je usporediva s veličinom penisa kod mužjaka istog razreda veličine
5	sjemenovod je uzrokovao razdjeljivanje kapsularne žlijezde, vulve više nema, veličina penisa je usporediva s veličinom penisa kod mužjaka istog razreda veličine, jedinke su sterilne (Slika 3.2.4.)



Slika 3.2.4. Ženka volka *Hexaplex trunculus* u stadiju 5 imposeksa s oznakama kapsularne žlijezde (kž) i sjemenovoda (s). Mjerna traka duljine 5 mm.

3.2.3. Stanični biomarkeri

Biološke analize opisane u nastavku obavljene su u Laboratoriju za ekotoksikologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Biomarkeri su analizirani na 6-10 jedinki volka iz svake od populacija koje su istraživane tijekom 2014. godine. Provedene su analize aktivnosti antioksidacijskih i biotransformacijskih enzima: katalaze (CAT), glutation S-transferaze (GST), glutation reduktaze (GR), sadržaj malondialdehida (MDA), sadržaj karbonila i aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE).

Priprema ekstrakata

Tkivo je izvagano i homogenizirano (uređaj Qiagen Retsch MM300 TissueLyser) sa čeličnim kuglicama (7 mm) 1 minutu na frekvenciji 30 kHz. Uzorku je potom dodano 1,2 mL kalij – fosfatnog pufera (50 mM, pH=7 + 10 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA)) te je homogenizacija ponovljena u istim uvjetima. Homogenat je centrifugiran (uređaj Sigma 3-18K) 12 minuta pri 10000 x g i 4ºC. Supernatant je odvojen i pohranjen na -80ºC.

Određivanje aktivnosti katalaze

Protokol za određivanje aktivnosti enzima katalaze preuzet je i prilagođen iz Aebi (1984). Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mL KP pufera (50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA) i 50 µl H_2O_2 (10 mM). U kvarcnu kivetu je dodano 950 µl reakcijske smjese te 50 µl 5 puta razrijeđenog ekstrakta (u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Pad apsorbancije mjeren je spektrofotometrijski (uređaj Specord 40) svakih 10 sekundi tokom 100 sekundi na 240 nm ($\varepsilon = 40$ mM^{-1} cm^{-1}). Za slijepu probu korišten je KP pufer (50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA).

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$(\Delta A * V_{kivete} *$ razrjeđenje uzorka$) / (V_{uzorka} * \varepsilon *$ proteini * promjer kivete * t)

Aktivnost katalaze izražena je u jedinicama po mg proteina, pri čemu jedna jedinica predstavlja hidrolizu 1 µmol H_2O_2 po minuti pri 25°C.

Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze

Protokol za određivanje aktivnosti glutation S-transferaza preuzet je i prilagođen iz Habig i suradnika (1974). Reakcijska smjesa sastojala se od 840 µl KP pufera (100 mM, pH 6,5 + 10 mM EDTA), 10 µL 100 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) (otopljenog u vrućem 95%tnom etanolu), 100 µL 10 mM GSH (otopljen u KP puferu, 100 mM, pH 6,5 + 10 mM EDTA) i 50 µL uzorka (pet puta razrijeđen u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski svake 3 sekunde tokom 1 minute na 340 nm ($\varepsilon = 9{,}6$ mM^{-1} cm^{-1}). Slijepa proba je bila reakcijska smjesa bez uzorka.

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$(\Delta A * V_{kivete} *$ razrjeđenje uzorka$) / (V_{uzorka} * \varepsilon *$ proteini * promjer kivete * t)

GST akivnost je izražena kao µmol konjugiranog glutationa po minuti i mg proteina pri 25°C.

Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Protokol za određivanje aktivnosti enzima glutation reduktaze preuzet je i prilagođen iz Ramos-Martinez i suradnika (1983). Reakcijska smjesa sastojala se od 500 µL 2 mM GSSG i 50 µL 2 mM NADPH (otopljeni u KP puferu, 100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA), 350 µL KP pufera (100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA) i 100 µL 5 puta razrijeđenog uzorka (u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski svakih 5 sekundi tokom 1,5 minute pri valnoj duljini 340 nm ($\varepsilon = 6{,}22$ mM^{-1} cm^{-1}). Za slijepu probu korišten je KP pufer (100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA).

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$(\Delta A * V_{kivete} *$ razrjeđenje uzorka$) / (V_{uzorka} * \varepsilon *$ proteini * promjer kivete * t)

Aktivnost glutation reduktaze izražena je u jedinicama po mg proteina, gdje jedna jedinica predstavlja oksidaciju 1 nmol NADPH po minuti pri 25°C.

Određivanje sadržaja malondialdehida

Stupanj lipidne peroksidacije određen je mjerenjem sadržaja malondialdehida po protokolu preuzetom i prilagođenom iz Buege i Aust (1978). Ukupno 150 µL nerazrijeđenog uzorka stavljeno je u Eppendorf epruvete sa 450 µL 10% TCA i centrifugirano 15 minuta pri 10000 g i 4ºC. U male staklene epruvete dvojeno je 550 µL supernatanta i dodano 550 µL 0,7% tiobarbiturne kiseline (TBA) (otopljene u 10% TCA) te je smjesa stavljena u sušionik (uređaj Bari, serija "est") na 15 minuta pri 90ºC do pojave crvenog obojenja. Nakon zagrijavanja smjesa je ohlađena na ledu. Apsorbancija supernatanta određena je spektrofotometrijski na 532 nm (ε = 155 mM^{-1} cm^{-1}), a korekcija za nespecifični turbitet napravljena oduzimanjem apsorbancije izmjerene na 600 nm. Za slijepu probu korišten je KP pufer (50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA).

Koncentracija malondialdehida određena je po formuli:

$(A_{(532)} - A_{(600)}) / (\varepsilon * \text{proteini} * \text{promjer kivete})$

Sadržaj MDA izražen je kao µmol po mg proteina.

Određivanje sadržaja karbonila

Sadržaj karbonila određen je po protokolu preuzetom i prilagođenom iz Levine i suradnika (1994). Ukupno 200 µL ekstrakta (razrijeđenog u omjeru 1:1 s KP puferom, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA) stavljeno je u Eppendorf epruvete sa 300 µL 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (otopljenog u 2 M HCl) te je smjesa inkubirana 1 sat u tami, na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije, smjesi je dodano 500 µL 10% trikloroctene kiseline (TCA) te je ohlađena 5 minuta na -20ºC. Smjesa je centrifugirana 10 minuta pri 12000 g i 4ºC. Dobiveni talog ispran je tri puta s 500 µL otopine etanola i etilacetata (1:1). Talog je otopljen u 1 mL 6 M uree u KP puferu (20 mM, pH 2,4). Sadržaj karbonila određen je spektrofotometrijski na 370 nm (ε = 22 mM^{-1} cm^{-1}), a sadržaj proteina procijenjen mjerenjem apsorbancije uzorka na 280 nm. Slijepa proba bila je 200 µL ekstrakta (razrijeđenog u omjeru 1:1 s KP puferom, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA) i 300 µl 2 M HCl.

Koncentracija proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja (od 0,096 mg mL^{-1} do 0,8 mg mL^{-1}) otopine albumina iz goveđeg seruma poznatih koncentracija (Sigma-Aldrich Protein Standard 2 mg proteina mL^{-1}) prema formuli:

$(A_{(280)} - l) / k$

Koncentracija karbonila određena je prema formuli:

$(A_{(370)} * \text{proteini}) / (\varepsilon * 1000)$

Sadržaj karbonila izražen je u μmol po mg proteina.

Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze

Protokol za mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze preuzet je i prilagođen iz Ellman i suradnika (1961). Reakcijska smjesa sastojala se od 850 μL KP pufera (100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA), 50 μL 8 mM 5,5'–ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) i 50 μL 8 mM acetilkolina (otopljeni u KP puferu, 100 mM, pH 7,4 + 10 mM EDTA) i 50 μL ekstrakta (pet puta razrijeđen u KP puferu, 50 mM, pH 7 + 10 mM EDTA). Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski na 412 nm svakih 10 sekundi kroz dvije minute ($\varepsilon = 0{,}07\ mM^{-1}\ cm^{-1}$). Slijepa proba je reakcijska smjesa bez uzorka.

Aktivnost enzima određena je prema formuli:

$(\Delta A * V_{kivete} * \text{razrjeđenje uzorka}) / (V_{uzorka} * \varepsilon * \text{proteini} * \text{promjer kivete} * t)$

Aktivnost AChE je izražena kao nmol nastalog tiokolina po minuti i mg proteina pri 25°C.

3.3. Kemijske analize

3.3.1. Analiza butilkositrovih spojeva u tkivu volka i sedimentu

Analiza butilkositrovih spojeva tributilkositra (TBT), dibutilkositra (DBT) i monobutilkositra (MBT) u sedimentu i mekom tkivu volka provedena je u Laboratoriju za anorgansku geokemiju okoliša i kemodinamiku nanočestica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Nakon obavljenih mjerenja vezanih uz biološke značajke volka pripremljeni su uzorci za određivanje masenog udjela butilkositrovih spojeva u tkivu volka. U istraživanju provedenom 2014. godine nasumično je odabrano 10 ženki iz svake populacije te je odvojeno tkivo visceralne zavojnice (hepatopankreas i gonade) od ostatka mekog tkiva. Pripremljena su po 2 uzorka po jedinci različita po vrsti tkiva. U istraživanjima provedenim 2015. godine, nasumično je odabrano 15 ženki i 15 mužjaka iz svake populacije te je odvojeno tkivo visceralne zavojnice od ostatka mekog tkiva. Zatim su pripremljeni kompozitni uzorci za svaki od spolova, odvojeno za uzorke tkiva visceralne zavojnice, a odvojeno za ostatak mekog tkiva. Pripremljeno je ukupno 3 kompozitna uzorka po svakoj populaciji za pojedini tip tkiva, pri čemu svaki pojedinačni kompozitni uzorak čini 5 jedinki. Tako pripremljeni uzorci tkiva i uzorci sedimenta su zamrznuti

na temperaturi od -20°C. Zamrznuti uzorci su sušeni liofiliziranjem, usitnjeni pomoću kugličnog mlina te čuvani na -20°C do daljnje kemijske analize.

Ekstrakcija builkositrovih spojeva (BuT) iz tkiva provedena je pomoću metode detaljno opisane u radu Furdek i suradnici (2012). Ukratko, ekstrakcija butilkositrovih spojeva iz homogeniziranog tkiva (1,0-1,5 g) provedena je otopinom klorovodične kiseline u metanolu (0,1 $molL^{-1}$, 10 mL) u ultrazvučnoj kupelji u vremenskom intervalu od 30 min. Suspenzija je centrifugirana 10 min pri 4200 okr min^{-1} i izdvojeni supernatant (ekstrakt) je korišten za daljnje analize. Izdvojeni ekstrakt (1 mL) je prenesen u 20 mL acetatnog pufera (pH=4,8; c=0,4 mol L^{-1}) te je dodana 1%-tna otopina natrij tetraetilborata (1 mL) i heksan (1 mL). Istovremena derivatizacija i ekstrakcija butilkositrovih spojeva u organsku fazu (heksan) provedena je mehaničkim miješanjem na tresilici pri 400 okr. min^{-1} kroz 30 minuta. Po završetku ekstrakcije, odvojena je organska faza s ekstrahiranim butilkositrovim spojevima.

Ekstrakcija butilkositrovih spojeva iz sedimenta provedena je korištenjem metode opisane u radovima Milivojevič Nemanič i suradnici (2009) i Furdek i suradnici (2016). Ukratko, ekstrakcija iz sedimenta (1-2 g) provedena je u octenoj kiselini (20 mL) primjenom ultrazvučne kupelji u vremenskom intervalu od 30 min. Istovremena derivatizacija i ekstrakcija provedena je na isti način kao što je opisano za ekstrakciju iz tkiva. Maseni udio butilkositrovih spojeva u ekstraktima tkiva i sedimenta određen je na plinskom kromatografu (GC, Varian CP3800) s pulsno-plamenim fotometrijskim detektorom (PFPD, Varian). Kontrola kvalitete mjerenja provedena je analizom standardnog referentnog materijala certificiranog za butilkositrove spojeve u morskom sedimentu (PACS 2, Ottawa, Canada) i dagnjama (CE 477, ERM, Geel, Belgium). Granice detekcije iznosile su 0,9 (TBT), 1,0 (DBT) i 1,9 (MBT) ng Sn g^{-1} (s.tv.).

3.3.2. Analiza stabilnih izotopa u tkivu volka

Analiza stabilnih izotopa u mišićnom tkivu volka odrađena je u laboratoriju Universidade da Coruna u Španjolskoj. Analiza je provedena na uzorcima volka prikupljenih iz 12 različitih populacija 2015. godine. Sa svake od ukupno 12 postaja nasumično su odabrana tri volka te je odvojeno mišićno tkivo. S obzirom da je istraživanje provedeno jednokratno, za analizu je odabrano mišićno tkivo jer ono, zbog svoje niže metaboličke aktivnosti od tkiva probavne žlijezde i gonada, predstavlja „uprosječene“ zapise o izvorima prehrane kroz dulje razdoblje (Ezgeta-Balić i sur., 2014). Pripremljeni uzorci mišićnog tkiva zamrznuti su na temperaturi -20°C te zaleđeni liofilizirani na temperaturi od 60°C (48 h) do konstantne mase, nakon čega su homogenizirani u tarioniku. Neposredno prije analize sadržaja stabilnih izotopa ugljika, uzorci su tretirani

klorovodičnom kiselinom kako bi se uklonio anorganski ugljik. Analiza tako pripremljenih uzoraka provedena je na masenom spektrofotometru (CF-IRMS). Rezultati istraživanja izraženi su kao δ vrijednosti $\delta^{15}N_{air}$ i $\delta^{13}C_{VPDB}$ (Coplen, 2011).

3.4. Statističke analize

Statističke analize provedene su u statističkom programu Statistica 8.0, osim PCA analize za koju je korišten program PAST 3.10. Homogenost varijanci testirana je Levenovim testom. Morfometrijska obilježja logaritamski su transformirana i standardizirana na duljinu kućice (normalizirana). Za usporedbu morfometrijskih obilježja te gonadosomatskog indeksa i indeksa kondicije među postajama korišten je Kruskal-Wallis test, osim za usporedbu grupiranih onečišćenih i referentnih postaja iz istraživanja provedenog 2014. godine kad je korišten Mann-Whitney U test. Kruskal-Wallis test korišten je i za: 1) usporedbu postaja (indeksi imposeksa, koncentracije butilkositrovih spojeva, morfometrijska obilježja, gonadosomatski indeks i indeksi kondicije, aktivnost biomarkera oksidativnog stresa), i 2) usporedbu različitih kategorija postaja iz istraživanja provedenog 2015. godine po prethodno nabrojenim parametrima (osim biomarkera koji nisu istraživani 2015. godine). Rezultati su prikazani dijagramima na kojima su iznad svake postaje prikazana slova koja označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Ukoliko postaja ima barem jedno isto slovo kao i neka druga, znači da između te dvije postaje nije utvrđena statistički značajna razlika. Mann-Whitney U test korišten je: 1) za usporedbu grupiranih onečišćenih i referentnih postaja iz istraživanja provedenog 2014. godine po različitim parametrima (indeksi imposeksa, maseni udjeli butilkositrovih spojeva, morfometrijska obilježja, gonadosomatski indeks i indeksi kondicije, aktivnost biomarkera oksidativnog stresa), i 2) usporedbu imposeksa po indeksima zabilježenim u istraživanjima 2005. (Prime i sur., 2006) i 2015. godine. Analiza korelacija među različitim parametrima provedena je korištenjem Spearman rang korelacije. Za uzorke u kojima je maseni udio butilkositrovih spojeva bio ispod granice detekcije, prilikom statističke obrade podataka uziman je maseni udio jednak polovici vrijednosti granice detekcije. Za međusobnu usporedbu aktivnosti biomarkera oksidativnog stresa korištena je analiza glavnih komponenti (PCA) biomarkera oksidativnog stresa. Za analizu sastava stabilnih izotopa dušika u mišićnom tkivu volka primijenjena je ugniježđena analiza varijance (ANOVA), Tukey test je primijenjen za post-hoc analizu. Zbog nehomogenih varijanci, za analizu stabilnih izotopa ugljika korišteni su Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U test.

4. REZULTATI

Istraživanje na vrsti *Hexaplex trunculus* podijeljeno je u dva dijela: (1) u prvom dijelu 2014. godine na 7 postaja koje su kategorizirane prema intenzitetu brodskog prometa provedeno je istraživanje imposeksa, prisutnosti butilkositrovih spojeva mjerenjem masenih udjela u tkivu volka, te aktivnosti odabranih biomarkera oksidativnog stresa u tkivu volka, i (2) u drugom dijelu 2015. godine na 12 postaja koje su također kategorizirane prema intenzitetu brodskog prometa provedeno je istraživanje imposeksa, prisutnosti butilkositrovih spojeva mjerenjem masenih udjela u tkivu volka i u sedimentu, te stabilnih izotopa ugljika i dušika u tkivu volka. Drugi dio istraživanja proveden je na istim postajama na kojima je imposeks istraživan i 2005. godine (Prime i sur., 2006), kako bi se istražila učinkovitost zabrane korištenja organokositara u protuobraštajnim bojama. Sukladno prethodnoj podjeli istraživanja u nastavku se daje prikaz rezultata po godinama.

4.1. Prvi dio istraživanja: 2014. godina

4.1.1. Morfometrijska obilježja, gonadosomatski indeks i indeks kondicije

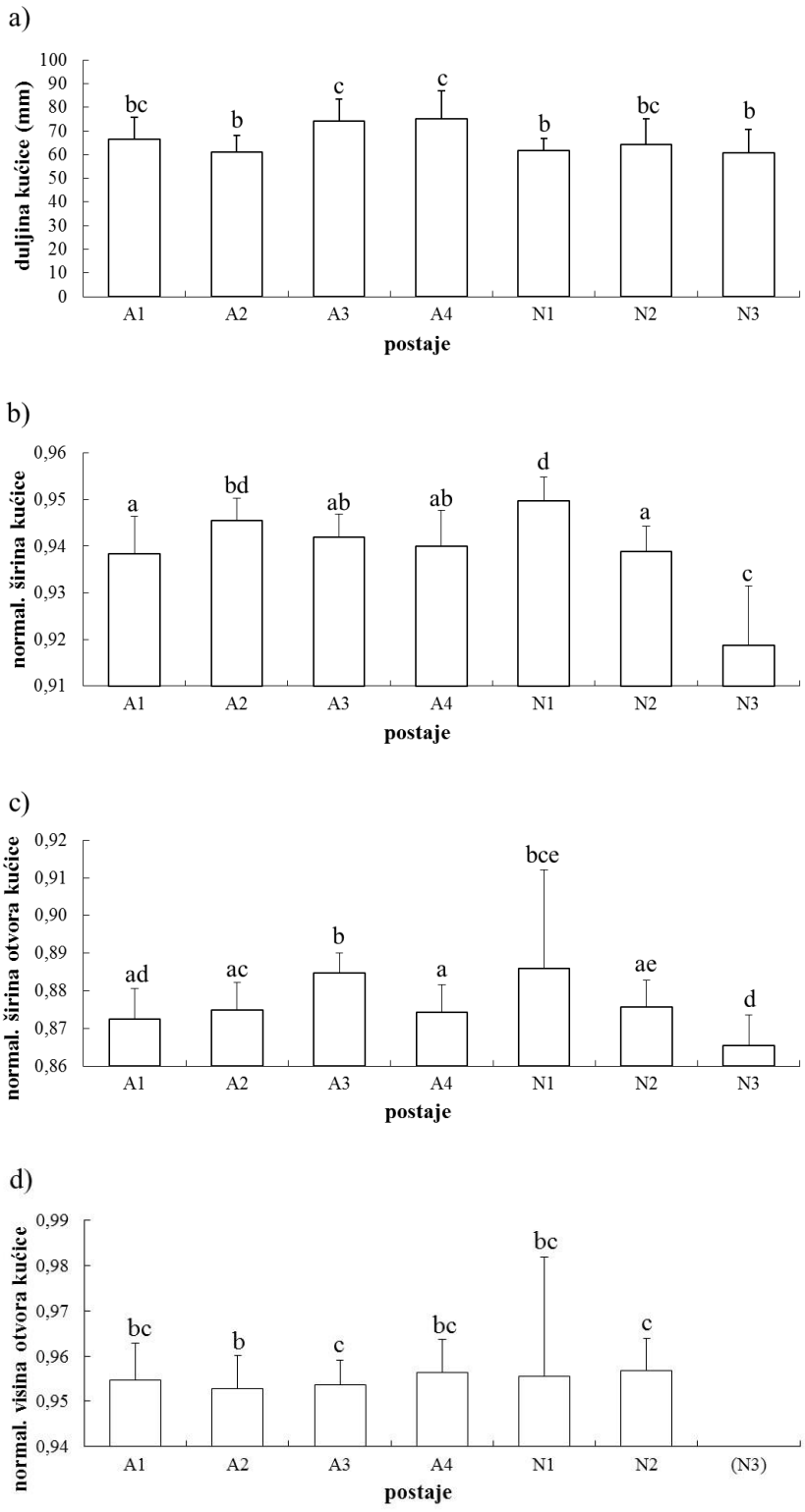
Tijekom 2014. godine ukupno je analizirano 428 jedinki vrste *Hexaplex trunculus*, 196 ženki i 232 mužjaka. Prosječna duljina kućice sakupljenih jedinki bila je 63,2±11,1 mm. Najmanja jedinka bila je duga 38,3 mm i uzorkovana je na postaji N1, a najveća 95,0 mm uzorkovana je na postaji A4 (Tablica 4.1.1.). Analizirane ženke prosječno su bile duge 65,8±10,7 mm, a mužjaci 61,1±11,0 mm (Slika 4.1.1.a i Slika 4.1.2.a). Utvrđena je značajna statistička razlika u duljini ženki i mužjaka ($U=17593$, $p<0,001$). Na onečišćenim postajama ženke ($U=16728$, $p<0,001$) i mužjaci ($U=5138$, $p=0,002$) su bili statistički značajno dulji nego na referentnim. Duljina ženki značajno se ne razlikuje među referentnim postajama, za razliku od mužjaka kod kojih je duljina jedinki s postaje N1 značajno manja od onih s postaje N2 ($p<0,001$). Kod onečišćenih postaja duljine jedinki kod postaje A2 značajno su manje od onih kod postaja A3 (mužjaci $p<0,001$, ženke $p<0,001$) i A4 (mužjaci $p=0,015$, ženke $p<0,001$), i kod mužjaka i kod ženki. Smatra se da je duljina kućice u najvećoj mjeri povezana sa starošću uzorkovanih jedinki i sukladno tome sva ostala morfometrijska obilježja normirana su na duljinu jedinki (Slika 4.1.1. i Slika 4.1.2.).

Tablica 4.1.1. Duljina kućice (TL) prikupljenih jedinki vrste *Hexaplex trunculus* prema postajama uzorkovanja (A - onečišćene, N - referentne): broj analiziranih jedinki (N), srednja vrijednost duljine kućice (sred.vrijed.), standardna devijacija (st.dev.), minimalna (min), i maksimalna (maks.) vrijednost.

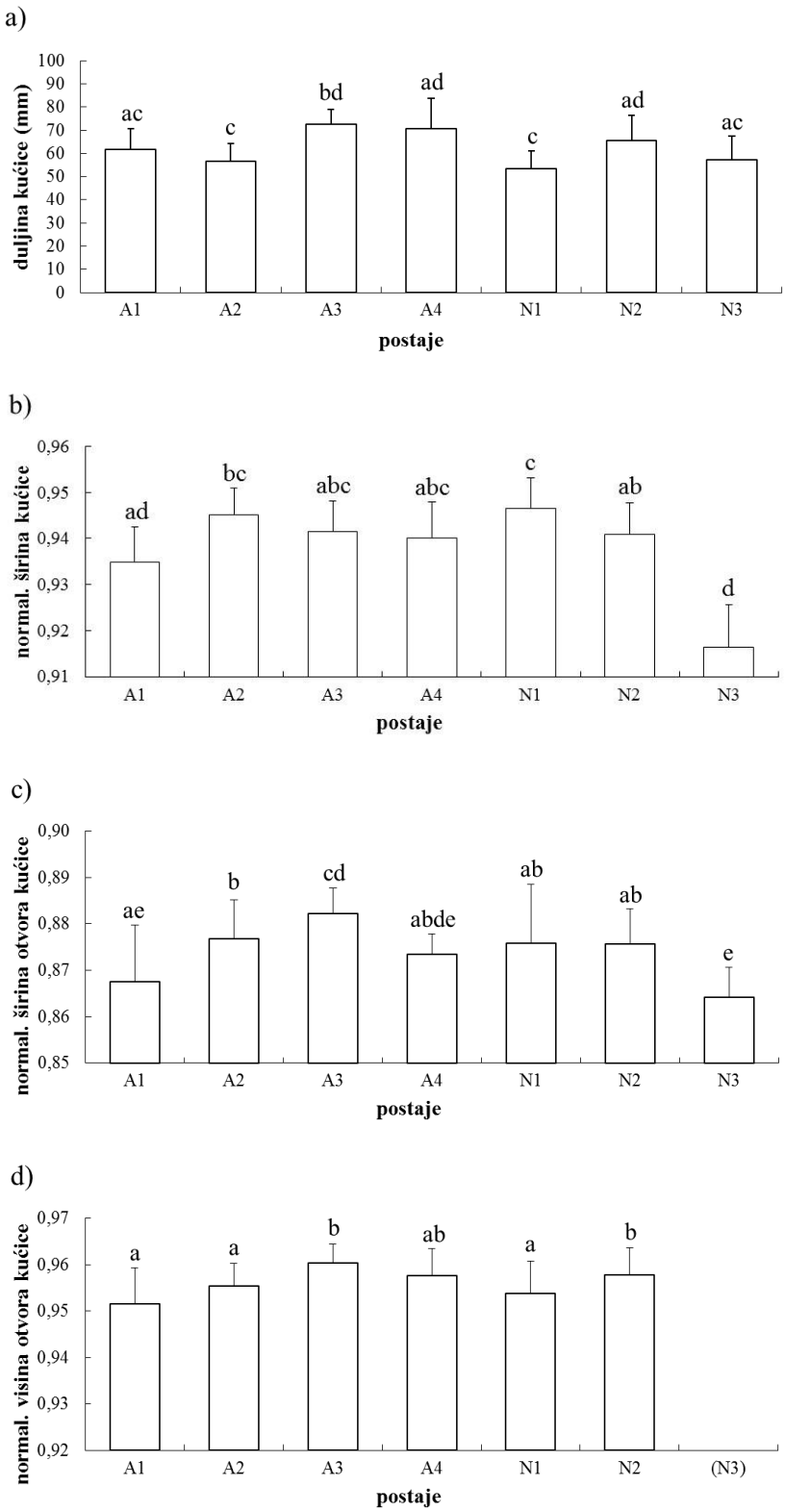
Postaja	N	TL (mm) sred.vrijed.	TL (mm) st.dev.	TL (mm) min.	TL (mm) maks.
A1	55	64,4	9,5	44,7	86,3
A2	75	58,3	7,7	41,7	86,3
A3	50	73,2	7,3	62,0	92,4
A4	38	73,9	12,2	51,4	95,0
N1	78	56,4	7,8	38,3	76,1
N2	78	65,1	10,8	41,1	87,1
N3	54	59,3	10,1	42,3	84,5
Ukupno/sred.vrijed./ min/maks	**428**	**63,2**	**11,1**	**38,3**	**95,0**

Širine kućice (TB') ženki međusobno se značajno statistički razlikuju među svim referentnim postajama (Slika 4.1.1.b). Među onečišćenim postajama značajno se razlikuju samo širine kućica ženki na postajama A1 i A2 (Slika 4.1.1.b). Kad se međusobno usporede sve postaje, bez obzira na onečišćenost postaje, širine kućice ženki s postaje N3 značajno se razlikuju od svih ostalih postaja, što nije slučaj i s postajama N1 i N2. Sličan princip slijede i mužjaci (Slika 4.1.2.b). Kad se usporede postaje grupirane po onečišćenosti, ženke s onečišćenih postaja imale su značajno veću širinu kućice ($U=3806$, $p=0,015$). Kod širine otvora kućice uglavnom su značajne razlike među postajama za ženke, kod mužjaka su razlike nešto slabije izražene. Visina otvora kućice kod ženki značajno je različita samo među postajama A3 i A4, dok su kod mužjaka značajne razlike među postajama snažnije izražene, neovisno o vrsti postaje. S obzirom na širinu i visinu otvora kućice nije bilo značajne razlike među postajama s obzirom na njihovu onečišćenost, osim što je širina otvora kućice mužjaka bila značajno veća kod mužjaka s onečišćenih postaja ($U=5302$, $p=0,006$).

Usporedbom različitih morfometrijskih obilježja ni kod ženki ni kod mužjaka nije utvrđena značajna korelacija, osim između širine otvora kućice i ostalih dimenzija pri čemu je najsnažnija korelacija sa širinom kućice (ženke: $r=0,61$, $p<0,05$; mužjaci: $r=0,49$, $p<0,05$), te kod mužjaka također i korelacija visine otvora kućice i ostalih dimenzija ($r=0,14$-$0,44$, $p<0,05$).

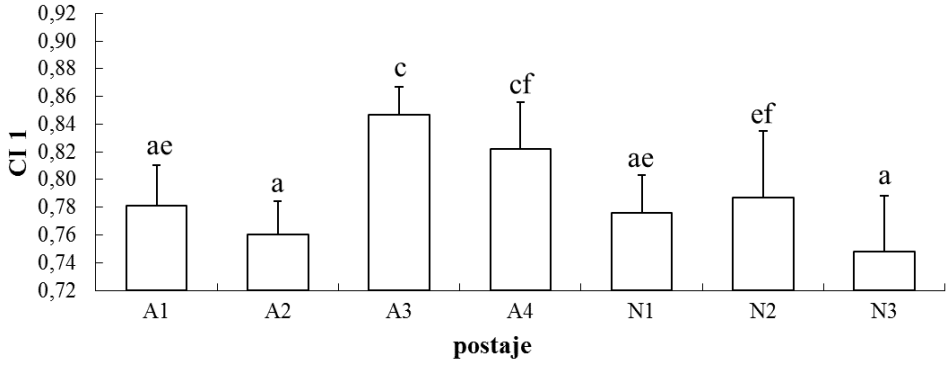


Slika 4.1.1. Morfometrijska obilježja (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Podatci za širinu kućice, širinu otvora kućice i visinu otvora kućice logaritamski su transformirani i standardizirani na duljinu kućice (normalizirani). Različita slova (a, b, c, d, e) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje. Visina otvora kućice nije mjerena na jedinkama s postaje N3.

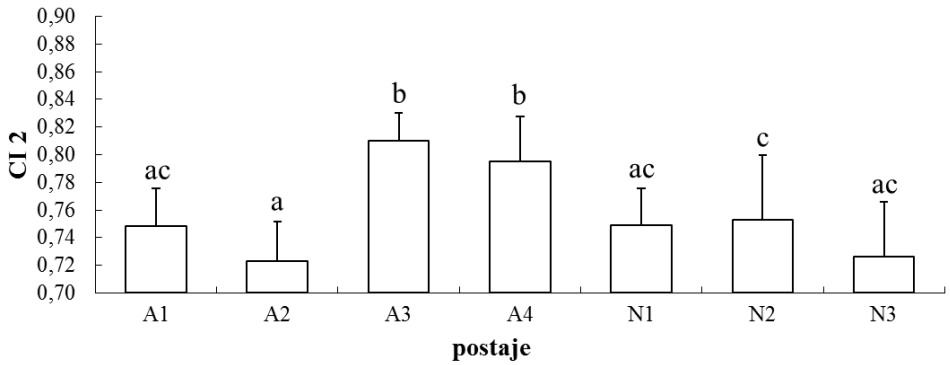


Slika 4.1.2. Morfometrijska obilježja (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Podatci za širinu kućice, širinu otvora kućice i visinu otvora kućice logaritamski su transformirani i standardizirani na duljinu kućice (normalizirani). Različita slova (a, b, c, d, e) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje. Visina otvora kućice nije mjerena na jedinkama s postaje N3.

Indeks kondicije 1 (CI 1 = ukupna masa mekog tkiva/duljina kućice) i kod ženki i kod mužjaka bio je najveći na postaji A3, kao i indeks kondicije 2 (CI 2 = masa ostatka mekog tkiva/duljina kućice), (Slika 4.1.3.). Utvrđena je visoka koreliranost između ova dva indeksa i kod ženki ($r=0,98$, $p<0,001$) i kod mužjaka ($r=0,97$, $p<0,001$). Indeks kondicije 3 (CI 3 = masa kućice/duljina kućice) kod ženki je najveći na postaji A2 (Slika 4.1.5.), a kod mužjaka na postaji N2 (Slika 4.1.8.). Najmanji CI 3 i kod ženki i kod mužjaka bio je na postaji A1. Utvrđena je značajna statistička razlika ovog indeksa kod ženki za postaje A1 i N1 u odnosu na ostale postaje (A1: $p<0,001$; N1: $p<0,007$). Indeks kondicije 3 ne korelira s indeksima kondicije CI 1 i CI 2 kod ženki. Kod mužjaka svi indeksi kondicije međusobno koreliraju iako je korelacija značajno niža između CI 3 i ostala dva indeksa ($r=0,15 – 0,17$, $p<0,05$), nego između CI 1 i CI 2 ($r=0,83 – 0,97$, $p<0,001$). Značajna razlika među onečišćenim i referentnim postajama zabilježena je za indekse kondicije CI 1 i CI 2 kod mužjaka (CI 1: $U=4917$, $p<0,001$; CI 2: $U=5071$, $p=0,001$) i ženki (CI 1: $U=3348$, $p<0,001$; CI 2: $U=3655$, $p=0,005$).

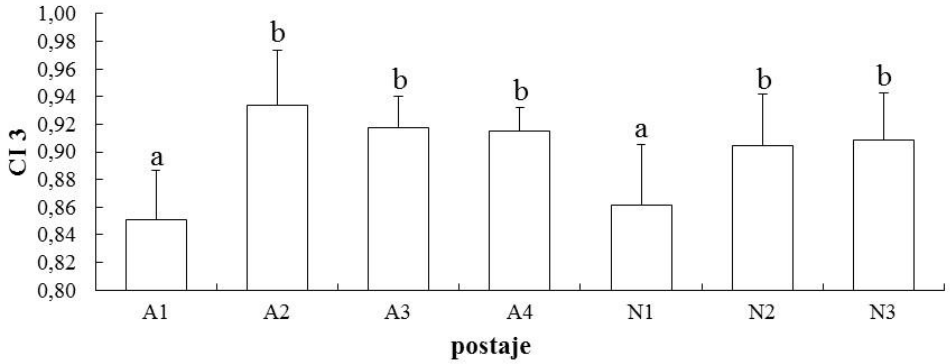


Slika 4.1.3. Indeks kondicije CI 1 = ukupna masa tkiva/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, c, e, f) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.

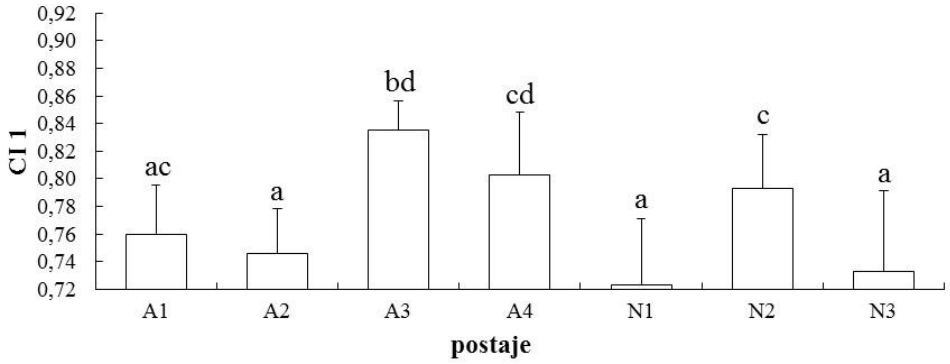


Slika 4.1.4. Indeks kondicije CI 2 = masa ostatka mekog tkiva/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci

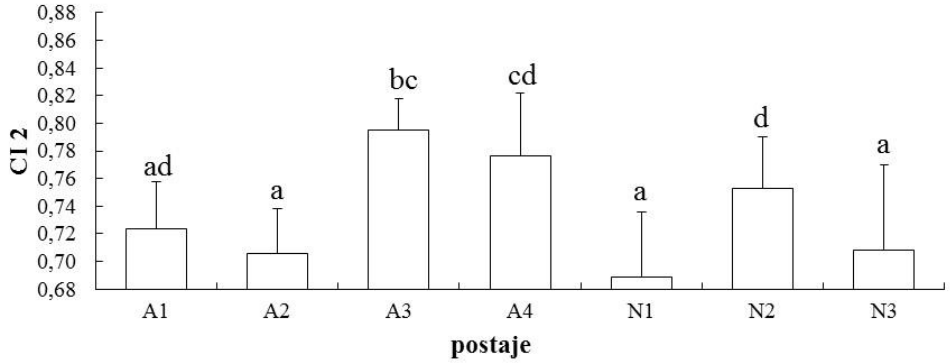
logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajno različite postaje (p<0,05). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.



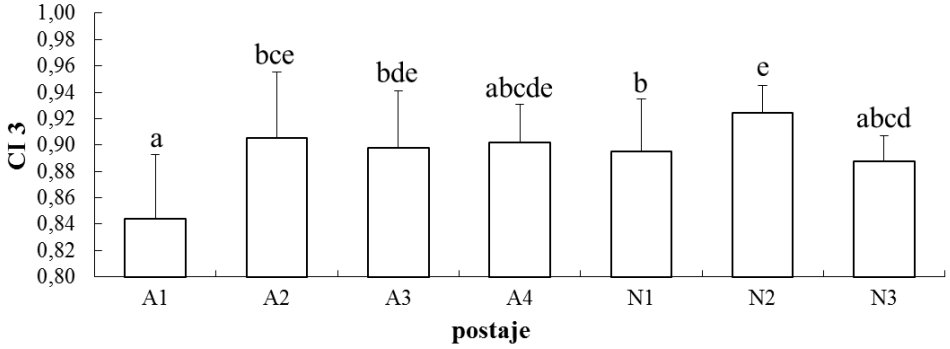
Slika 4.1.5. Indeks kondicije CI 3 = masa kućice/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b) označavaju statistički značajno različite postaje (p<0,05). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.



Slika 4.1.6. Indeks kondicije CI 1 = ukupna masa mekog tkiva/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d) označavaju statistički značajno različite postaje (p<0,05). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.

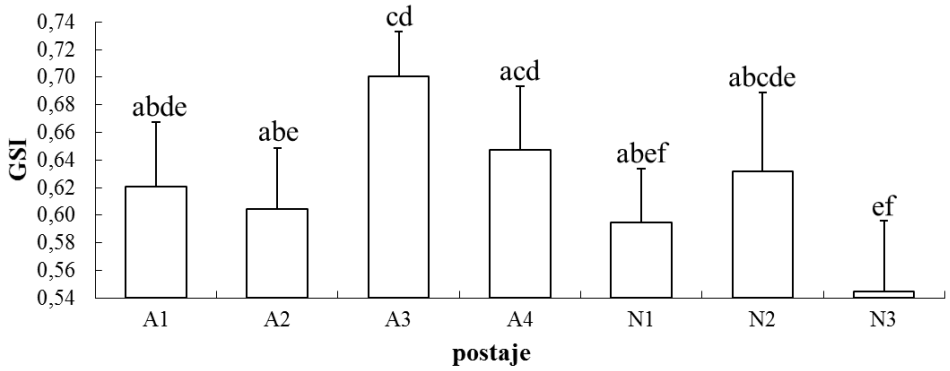


Slika 4.1.7. Indeks kondicije CI 2 = masa ostatka mekog tkiva/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d) označavaju statistički značajno različite postaje (p<0,05). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.

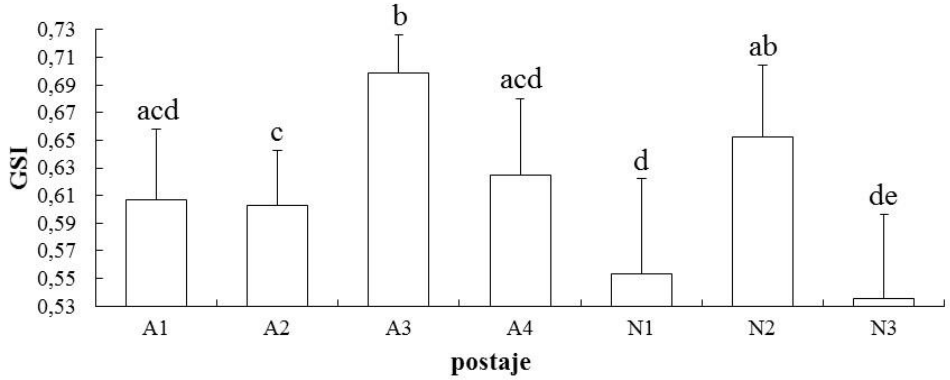


Slika 4.1.8. Indeks kondicije CI 3 = masa kućice/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.

Gonadosomatski indeks (GSI) ženki bio je najveći na postaji A3, a najmanji na postaji N3, i kod ženki i kod mužjaka (Slika 4.1.9., Slika 4.1.10.). Ako se usporede referentne i onečišćene postaje, GSI je značajno veći na onečišćenim postajama u odnosu na referentne postaje i kod ženki ($U=2821$, $p<0,001$) i kod mužjaka ($U=4469$, $p<0,001$).



Slika 4.1.9. Gonadosomatski indeks GSI = masa gonada i hepatopankreasa/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e, f) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.



Slika 4.1.10. Gonadosomatski indeks GSI = masa gonada i hepatopankreasa/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.

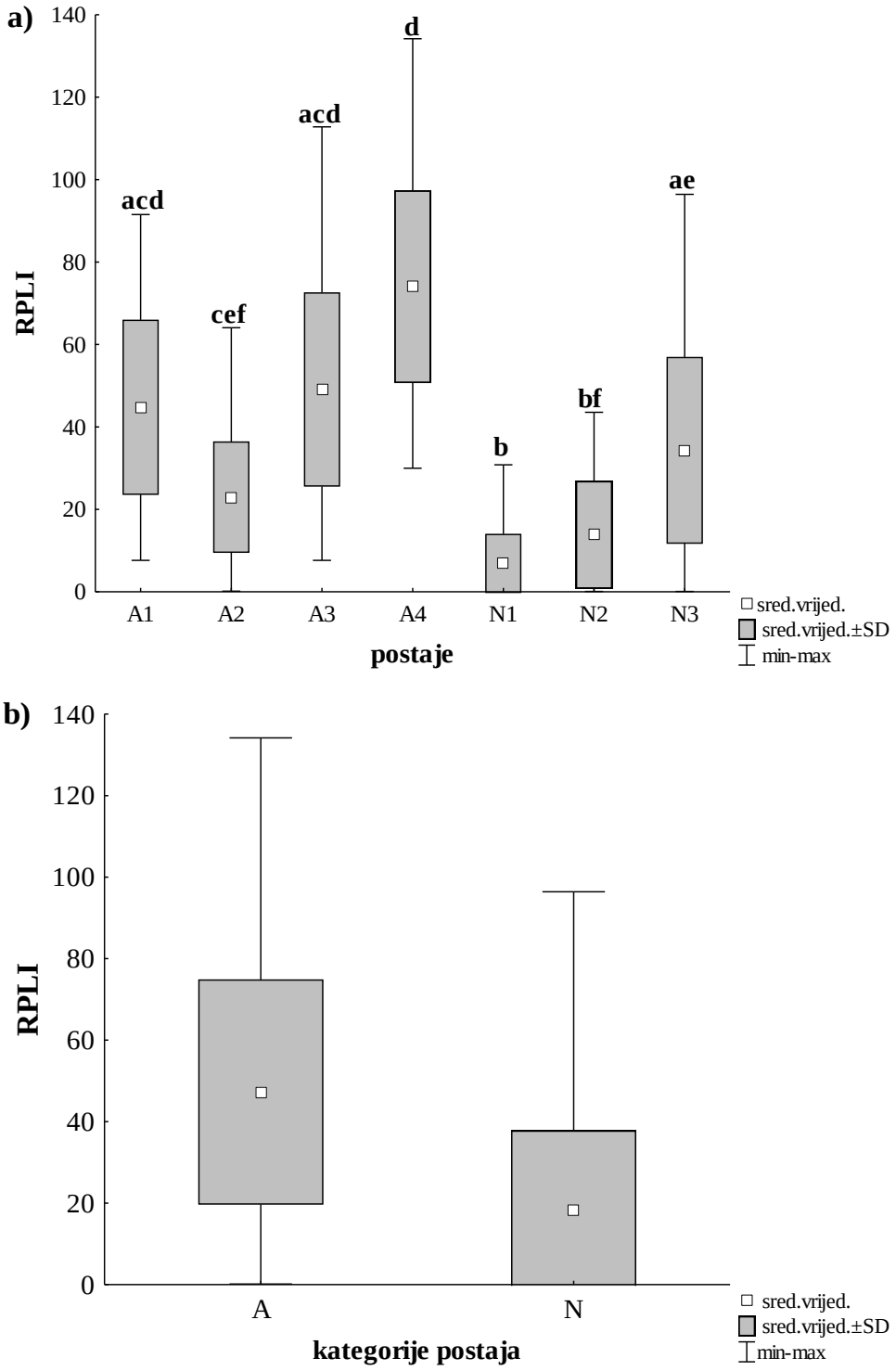
4.1.2. Imposeks

Na svim postajama istraživanim 2014. godine kod ženki vrste *Hexaplex trunculus* zabilježen je imposeks (Tablica 4.1.2). Imposeks je zabilježen kod više od 88% ženki čak i na postajama koje su kategorizirane kao referentne. Najmanje vrijednosti VDSI, RPLI i RPSI zabilježene su na referentnoj postaji N1 koja se jedina nalazi unutar zaštićenog područja prirode. Na ovoj postaji VDSI se kretao između 0 i 4,3. Najveće vrijednosti RPSI (26,94%) i VDSI (≥4,3), odnosno najveći intenzitet imposeksa, zabilježeni su kod populacije na postaji A4 (onečišćena postaja). Visoke vrijednosti RPSI zabilježene su i na onečišćenim postajama A1 i A3, ali i na referentnoj postaji N3. Indeks VDSI ipak je izraženiji kod svih onečišćenih postaja u usporedbi s vrijednostima referentnih postaja. Sterilne ženke (VDS=5) zabilježene su na svim istraživanim postajama osim na referentnim postajama N1 i N3.

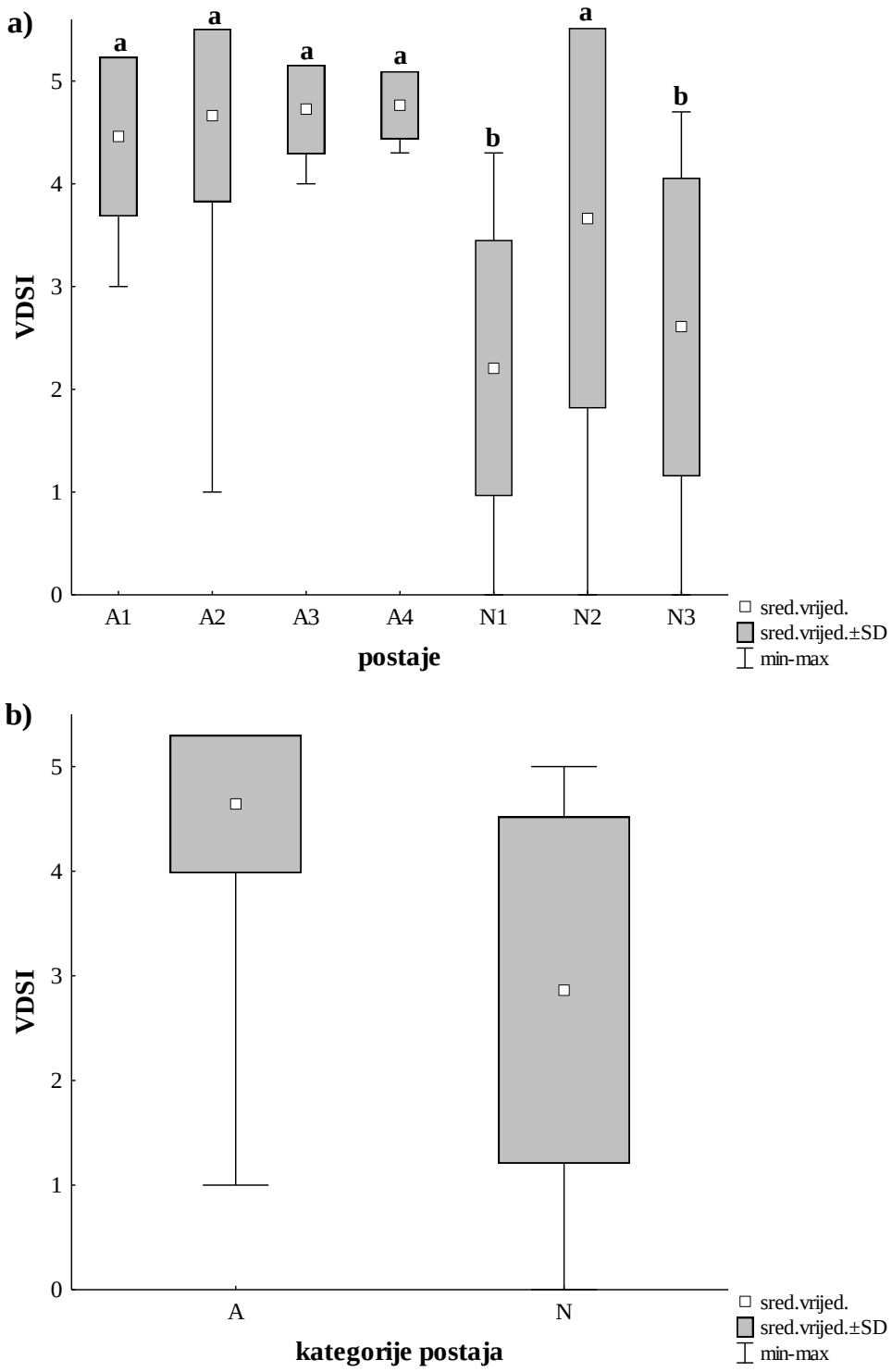
Tablica 4.1.2. Pregled rezultata istraživanja imposeksa iz 2014. godine na vrsti *Hexaplex trunculus* (duljina kućice, postotak ženki s imposeksom, postotak sterilnih ženki, duljina penisa ± standardna devijacija, indeks relativne duljine penisa (RPLI), indeks relativne veličine penisa (RPSI), vas deferens indeks (VDSI) ± standardna devijacija). A - onečišćene postaje, N - referentne postaje.

Postaja	Spol	Br. jed.	Duljina kućice (mm)	Ženke s imposeksom (%)	Sterilne ženke (%)	Duljina penisa (mm)	RPLI (%)	RPSI (%)	VDSI
A1	M	24	61,8±9,0			10,6±2,2			
	F	31	66,5±9,5	100	48	5,5±1,7	48,48	11,40	4,5±0,8
A2	M	46	56,5±7,7			14,5±4,1			
	F	29	61,0±7,1	100	76	5,9±2,4	21,51	1,00	4,7±0,8
A3	M	32	72,6±6,3			14,8±2,0			
	F	18	74,3±9,0	100	67	8,7±2,3	36,51	4,87	4,7±0,4
A4	M	10	70,6±13,2			12,2±2,8			
	F	28	75,1±11,9	100	64	4,9±1,7	64,59	26,94	4.8±0.3
N1	M	51	53,5±7,5			13,3±2,6			
	F	27	61,7±5,0	96	0	6,4±1,5	7,91	0,05	2,2±1,2
N2	M	46	65,7±10,8			13,6±3,4			
	F	32	64,2±10,8	88	44	4,4±1,9	12,30	0,19	3,7±1.9
N3	M	23	57,2±10,2			12,2±2,7			
	F	31	60,8±9,9	90	0	0,9±0,3	34,32	4,04	2.6±1.5

Usporedba različitih postaja pokazala je da se indeks imposeksa RPLI statistički značajno ne razlikuje među onečišćenim postajama (Slika 4.1.11.a), osim među A2 i A4 ($H=115,0$, $p<0,001$). Referentna postaja N3 značajno se razlikuje od druge dvije referentne postaje N1 i N2, kao i od lokacije A4, ali ne i od ostalih onečišćenih postaja. Statistički značajne razlike nema ni među postajama N1 i N2, kad se govori o RPLI. Kad se sve uzorkovane jedinke kategoriziraju u dvije grupe – onečišćene i referentne (Slika 4.1.11.b), RPLI je značajno veći kod jedinki prikupljenih na onečišćenim postajama ($U=1695$, $p<0,001$). Indeks imposeksa VDSI (Slika 4.1.12.a) ne razlikuje se značajno statistički među onečišćenim postajama ($H=91,2$, $p<0,001$). Referentna postaja N2 prema indeksu VDSI statistički se značajno razlikuje od druge dvije referentne postaje N1 i N3, ali ne i od onečišćenih postaja. Postaje N1 i N3 se značajno ne razlikuju. I kod indeksa VDSI, kad se sve uzorkovane jedinke kategoriziraju u dvije grupe – onečišćene i referentne (Slika 4.1.12.b), VDSI je značajno veći kod onečišćenih postaja ($U=1620$, $p<0,001$).



Slika 4.1.11. Usporedba indeksa relativne duljine penisa (RPLI) jedinki volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine po: (a) pojedinačnim postajama, (b) različitim kategorijama postaja kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje). Slova (a, b, c, d, e, f) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

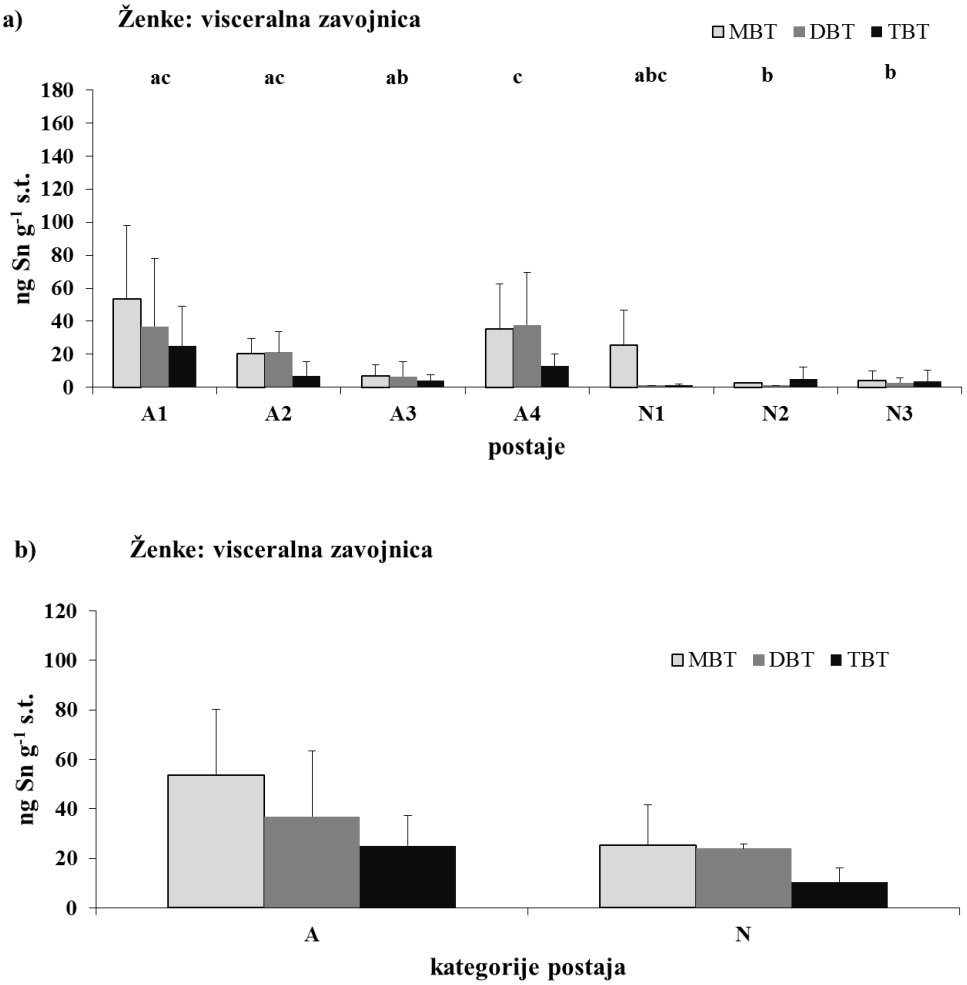


Slika 4.1.12. Usporedba vas deferens indeksa (VDSI) jedinki volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2014. godine po: (a) pojedinačnim postajama, (b) različitim kategorijama postaja ovisno o brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje). Slova (a,b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

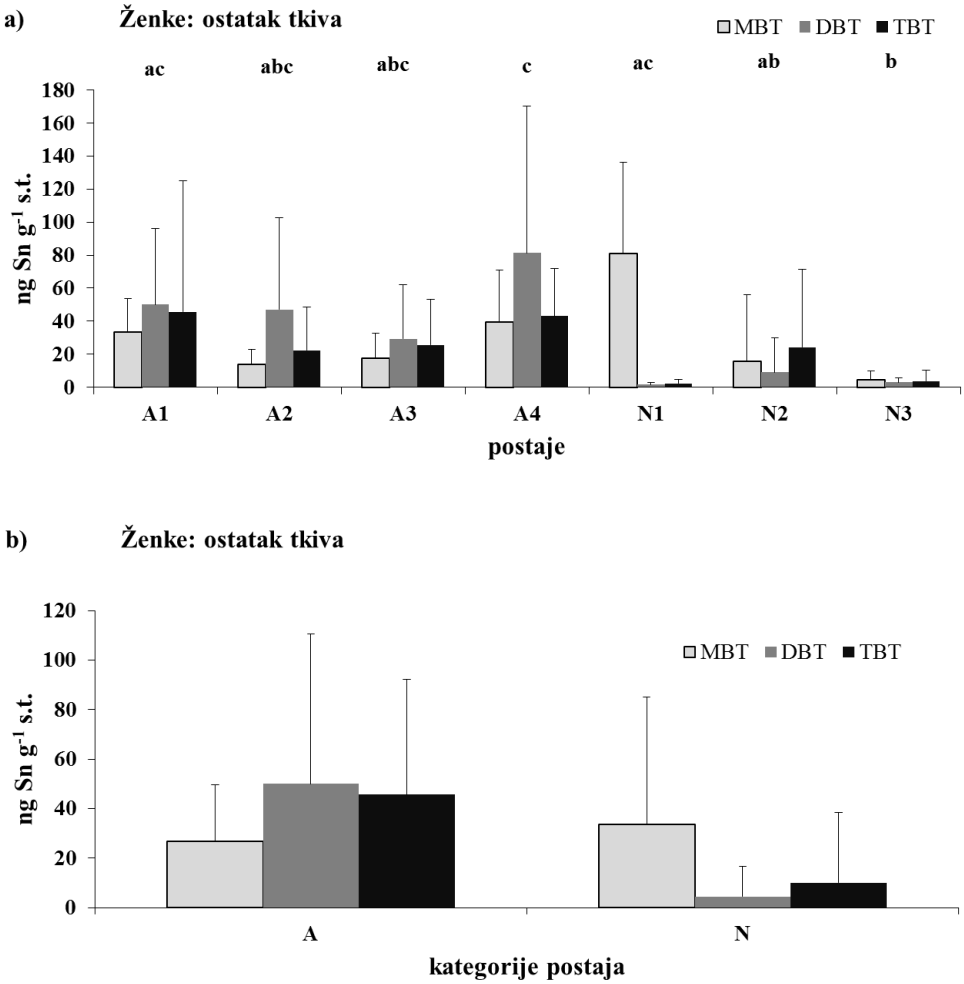
4.1.3. Butilkositrovi spojevi u tkivima volka *Hexaplex trunculus*

Maseni udjeli butilkositrovih spojeva (monobutilkostra MBT, dibutilkositra DBT i tributilkositra TBT) u tkivima ženki volka *Hexaplex trunculus* sakupljenih na 7 postaja uz jadransku obalu tijekom 2014. godine analizirane su posebno za visceralnu zavojnicu (probavna žlijezda i gonade) i posebno za ostatak tkiva, osim na postaji N3 za koju tkivo nije razdvajano po tipu (u statističkim analizama uzeto da su maseni udjeli pojedinih butilkositrovih spojeva isti kod oba tipa tkiva). Rezultati analiza prikazani su na slikama 4.1.13. i 4.1.14. Srednji maseni udio ∑BuT (∑BuT=TBT+DBT+MBT) kod ženki u tkivu visceralne zavojnice na onečišćenim postajama (115,4±58,7 ng Sn g^{-1} s.t.) bio je dva puta veći od onog na referentnim postajama (59,8±16,1 ng Sn g^{-1} s.t.). U ostatku tkiva ženki srednji maseni udio ∑BuT na onečišćenim postajama (122,4±108,9 ng Sn g^{-1} s.t.) bio je 2,5 puta veći od onog na referentnim postajama (48,0±64,3 ng Sn g^{-1} s.t.). Najviši maseni udio ∑BuT izmjeren je u uzorcima ostatka tkiva s onečišćene postaje A4 (163,9±126,0 ng Sn g^{-1} s.t.) te u uzorcima tkiva visceralne zavojnice s onečišćene postaje A1 (115,4±97,7 ng Sn g^{-1} s.t.). Na referentnim postajama maseni udio DBT i TBT bio je najčešće ispod granice detekcije. Izmjereni maseni udjeli TBT-a na onečišćenim postajama variraju, pa i unutar samih postaja, od masenih udjela ispod granice detekcije izmjerenih u tkivu visceralne zavojnice jedinke uzorkovane na postaji A3, do 267,0 ng Sn g^{-1} s.t. izmjerenih u ostatku tkiva jedinke uzorkovane na postaji A1. Udio TBT-a u ∑BuT je manji od udjela DBT i MBT na svim postajama, osim na postaji N2 (slike 4.1.15. i 4.1.16.). Uzimajući u obzir obje vrste tkiva udio TBT-a u ∑BuT je bio 3-35%, osim kod postaje N2 gdje je iznosio 50-58%. MBT na lokaciji N1 je bio dominantan s udjelom u ∑BuT 92-96%, dok se kod ostalih postaja kretao u vrijednosti 16-46%.

Mann Whitney testom potvrđeno je da su maseni udjeli ∑BuT bili značajno veći ($p<0,001$) u populacijama s onečišćenih postaja u odnosu na one s referentnih postaja i to uzimajući u obzir obje vrste tkiva ženki. Značajnih razlika u masenom udjelu TBT-a nije bilo unutar onečišćenih postaja kao ni unutar referentnih postaja. Maseni udjeli ∑BuT u različitim tkivima nisu bili značajno različiti unutar populacija s referentnih postaja. Maseni udjeli DBT-a i TBT-a značajno su se razlikovali u različitim tipovima tkiva kod onečišćenih postaja: maseni udjeli su bili značajno manji u tkivu visceralne zavojnice (DBT: $U=466$, $p<0,05$; TBT: $U=311$, $p<0,001$).

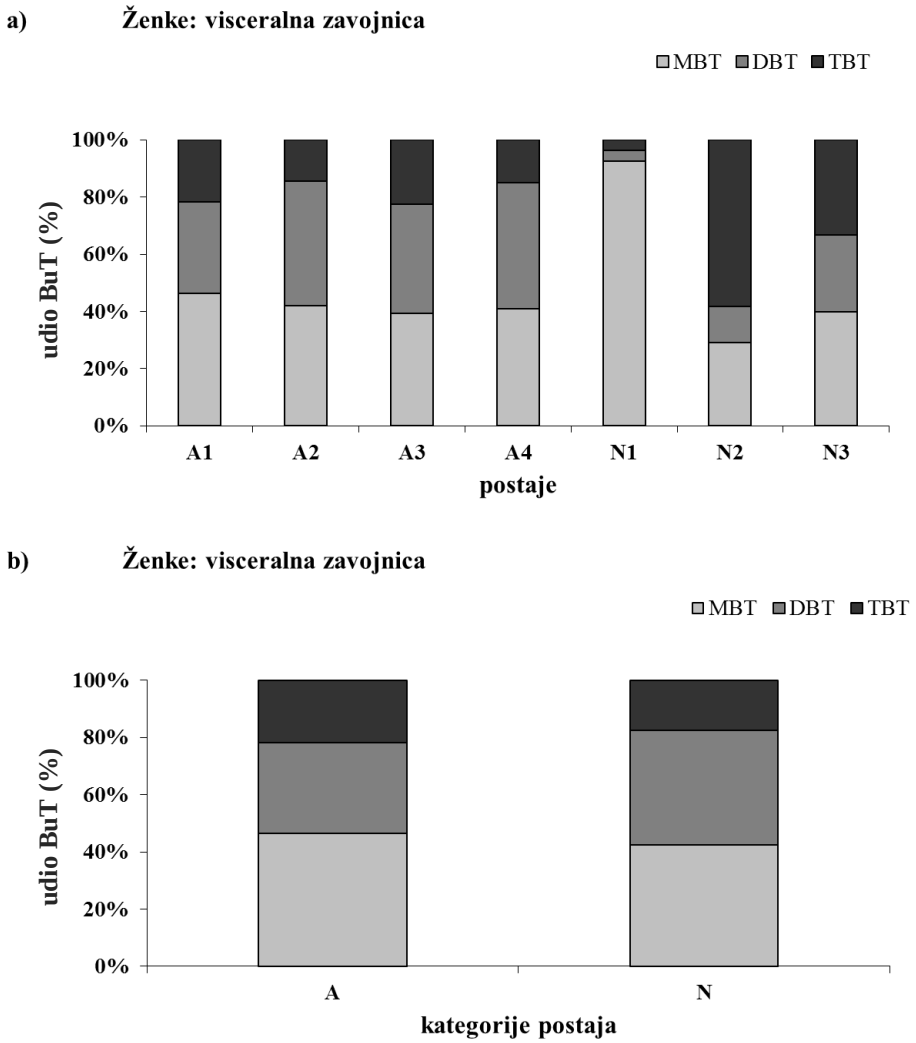


Slika 4.1.13. Prosječni maseni udjeli butilkositrovih spojeva (monobutilkositra MBT, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u tkivu visceralne zavojnice ženki vrste *Hexaplex trunculus* sakupljenih u 2014. godini na: (a) pojedinačnim postajama, (b) različitim kategorijama postaja ovisno o brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje). Srednje vrijednosti prikazane su s pratećom standardnom devijacijom: srednja vrijednost + standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajno različite kategorije postaja (a, b, c) s obzirom na ukupne butilkositrove spojeve ∑BuT ($p<0,05$).

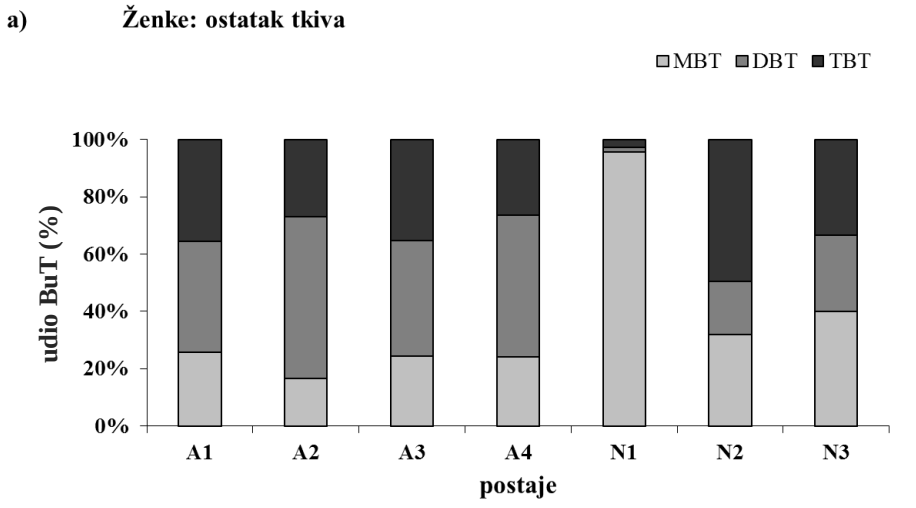


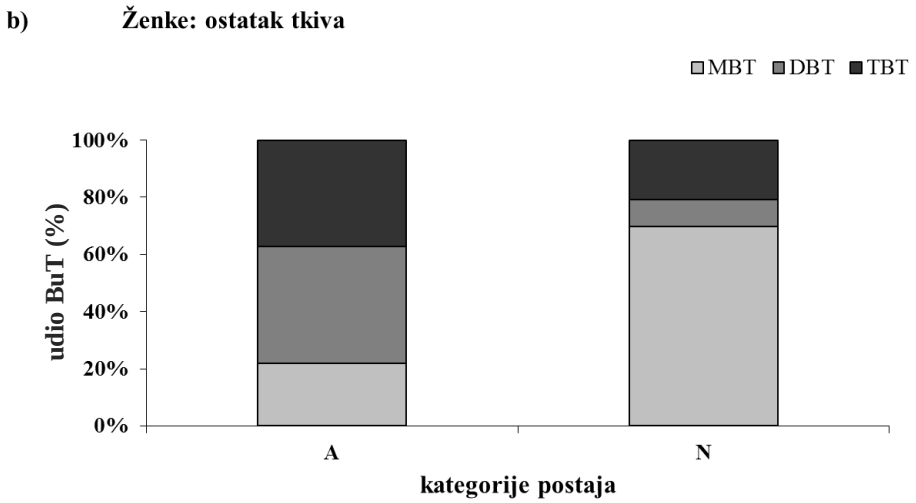
Slika 4.1.14. Prosječni maseni udjeli butilkositrovih spojeva (monobutilkositra MBT, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u ostatku tkiva ženki vrste *Hexaplex trunculus* sakupljenih u 2014. godini na: (a) pojedinačnim postajama, (b) različitim kategorijama postaja ovisno o brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje). Srednje vrijednosti prikazane su s pratećom standardnom devijacijom: srednja vrijednost + standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajno različite kategorije postaja (a, b, c) s obzirom na ukupne butilkositrove spojeve ∑BuT ($p<0,05$).

Međusobnom usporedbom masenih udjela butilkositrovih spojeva TBT-a, DBT-a i MBT-a u različitim tkivima volka (visceralna zavojnica vz, ostatak mekog tkiva ot) bile su utvrđene sljedeće statistički značajne korelacije ($p<0,05$): TBT_{vz} vs DBT_{vz}, r=0,72; TBT_{vz} vs MBT_{vz}, r=0,35; DBT_{vz} vs MBT_{vz}, r=0,62; TBT_{ot} vs DBT_{ot}, r=0,84; DBT_{ot} vs MBT_{ot}, r=0,30). Također, među svim butilkositrovim spojevima istog tipa, ali iz različitih tkiva, utvrđene su statistički značajne korelacije ($p<0,05$; TBT_{vz} vs TBT_{ot}: r=0,48; DBT_{vz} vs DBT_{ot}: r=0,67; MBT_{vz} vs MBT_{ot}: r=0,36).



Slika 4.1.15. Prosječni udjeli pojedinih butilkositrovih spojeva (monobutilkostra MBT, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u zbroju butilkositrovih spojeva (∑BuT) u tkivu visceralne zavojnice ženki vrste *Hexaplex trunculus* sakupljenih u 2014. godini na: (a) pojedinačnim postajama, (b) različitim kategorijama postaja ovisno o brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje).

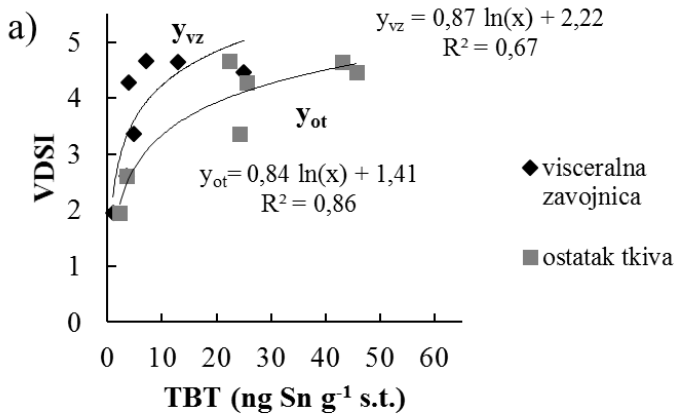


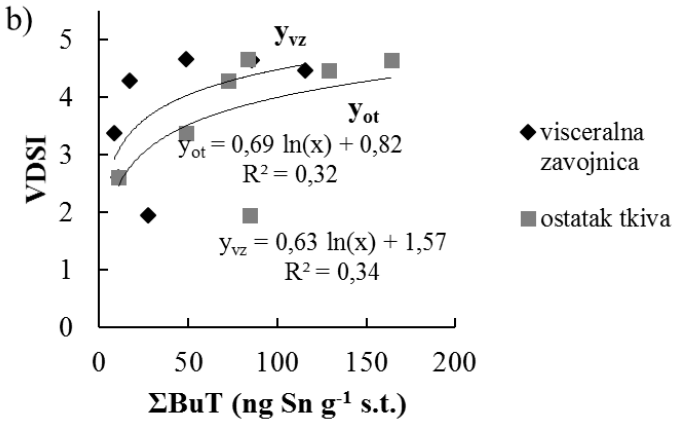


Slika 4.1.16. Prosječni udjeli pojedinih butilkositrovih spojeva (monobutilkostra MBT, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u zbroju butilkositrovih spojeva (∑BuT) u ostatku tkiva ženki vrste *Hexaplex trunculus* sakupljenih u 2014. godini na: (a) pojedinačnim postajama, (b) različitim kategorijama postaja ovisno o brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje).

4.1.4. Povezanost imposeksa i masenog udjela butilkositrovih spojeva kod vrste *Hexaplex trunculus*

Usporedba masenih udjela TBT-a sa stadijima VDS pokazala je nagli porast VDSI već na vrlo niskim razinama TBT-a, pa se najviši stadiji VDS (VDS>4) javljaju već na masenim udjelima TBT-a nižim od 8 ng Sn g^{-1} (Slika 4.1.17.). Prema istraživanju provedenom 2014. godine stadij VDS=5 odgovara srednjoj vrijednosti masenog udjela TBT-a od 24,4 ng Sn g^{-1} u tkivu visceralne zavojnice odnosno prosječnom masenom udjelu ∑BuT od 71,8 ng Sn g^{-1}.





Slika 4.1.17. Odnos VDSI i (a) masenog udjela tributilkositra (TBT), i (b) ukupnih butilkositrovih spojeva (∑BuT) u tkivu visceralne zavojnice (vz) i ostatku tkiva (ot) vrste *Hexaplex trunculus* prema istraživanjima provedenim u 2014. godini.

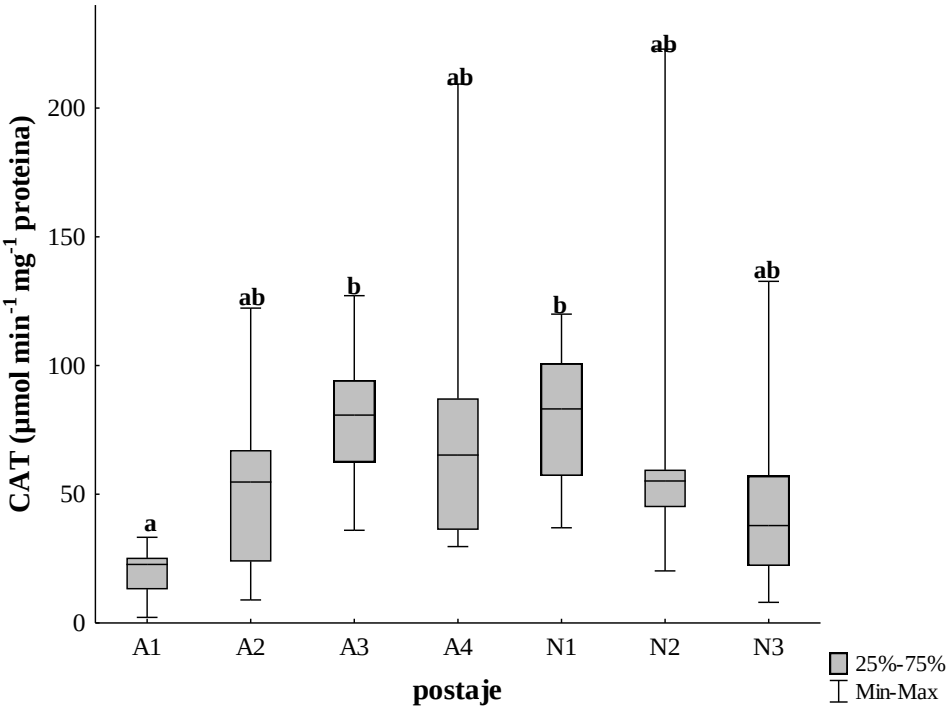
Statistički značajne korelacije ostvarene su između indeksa imposeksa (RPLI, RPSI, VDSI) i masenih udjela TBT-a i ∑BuT u obje analizirane vrste tkiva (Tablica 4.1.3.). Korelacije u obje vrste tkiva nešto su jače između različitih indeksa imposeksa i masenog udjela TBT-a, nego između indeksa imposeksa i ∑BuT. Značajne korelacije također su uočene između VDSI i RPLI odnosno RPSI (r=0,76, p<0,001).

Tablica 4.1.3. Spearman rang korelacija između pojedinih različitih indeksa imposeksa i masenog udjela butilkositrovih spojeva (TBT, ∑BuT) u tkivu visceralne zavojnice i ostatku tkiva volka *Hexaplex trunculus* (p<0,001).

	VDSI vs ∑BuT	**RPLI vs ∑BuT**	**RPSI vs ∑BuT**	**VDSI vs TBT**	**RPLI vs TBT**	**RPSI vs TBT**
tkivo visc. zavoj.	0,48	0,55	0,55	0,68	0,60	0,60
ostatak tkiva	0,48	0,41	0,41	0,77	0,79	0,79

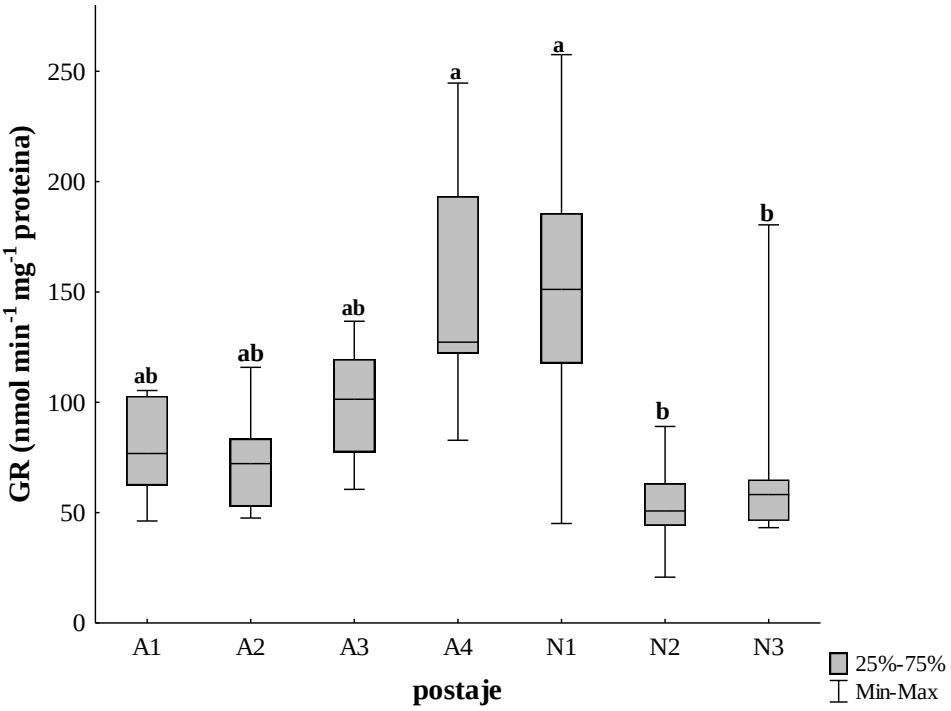
4.1.5. Biomarkeri oksidativnog stresa

Aktivnost antioksidativnih enzima te količina produkata oksidativnog stresa u jedinkama uzorkovanim 2014. godine su dosta varirali i između i unutar postaja različite kvalitete okoliša. Najveće aktivnosti enzima katalaze izmjerene su na postajama A3 i N1, a najmanje na postaji A1 koja se jedina značajno razlikuje od prethodno spomenute dvije postaje (H=19,78, p=0,003, Slika 4.1.18.), ali ne i od preostalih postaja. Nije bilo značajne razlike u aktivnosti katalaze na referentnim u odnosu na onečišćene postaje (U=484, p=0,934).



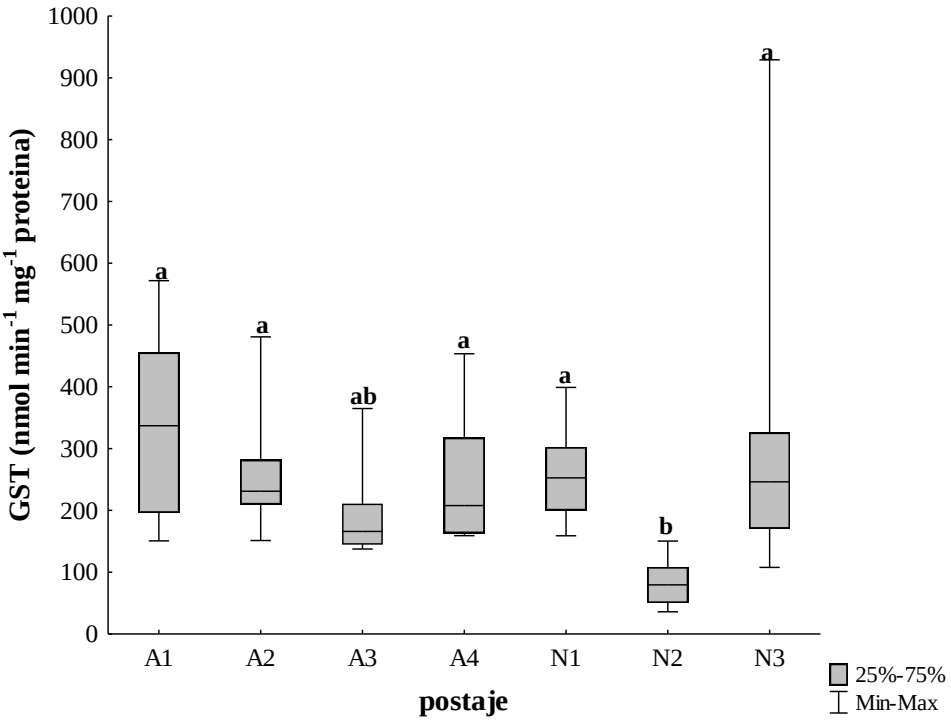
Slika 4.1.18. Aktivnosti enzima katalaze (CAT) mjerene spektrofotometrijski u tkivu volaka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih na različitim postajama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje) 2014. godine (medijan, donji/gornji kvartil i min./max. vrijednosti). Slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

Enzim glutation reduktaza pokazao je povećanu aktivnost na postajama A4 i N1 (Slika 4.1.19.). Najniža aktivnost ovog enzima bila je na postajama N2 i N3. Značajne razlike aktivnosti enzima glutation reduktaza upravo su među prethodno nabrojenim parovima postaja ($H=32,0$, $p<0,001$). Kod ovog enzima zabilježene su značajne razlike u aktivnosti enzima na referentnim u odnosu na onečišćene postaje ($U=326$, $p=0,024$).



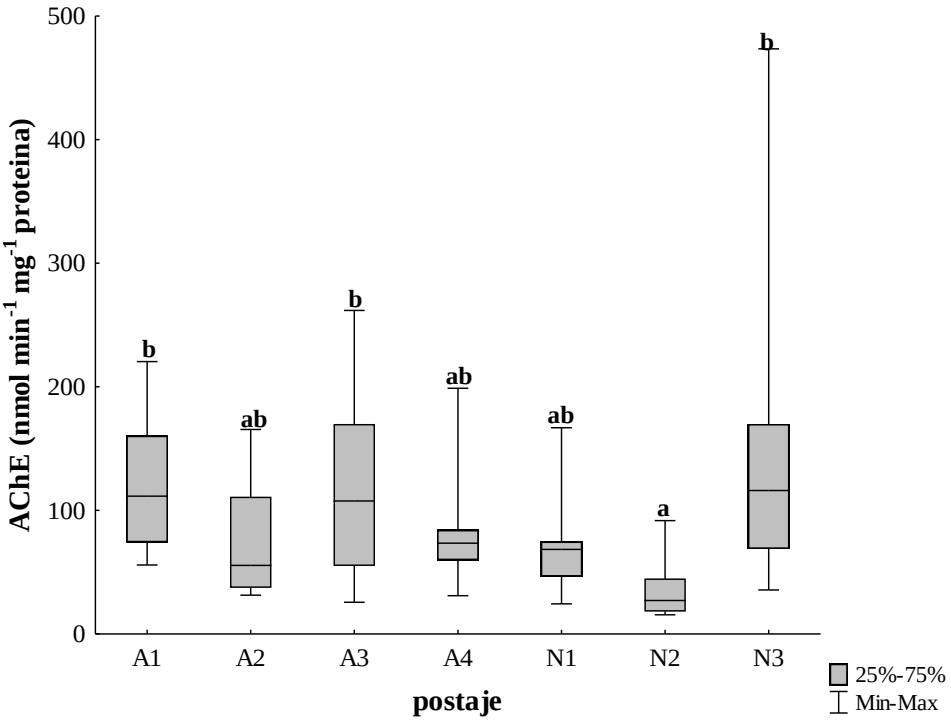
Slika 4.1.19. Aktivnosti enzima glutation reduktaze (GR) mjerene spektrofotometrijski u tkivu volaka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih na različitim postajama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje) 2014. godine (medijan, donji/gornji kvartil i min./max. vrijednosti). Slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

Najveća aktivnost enzima glutation S-transferaza zabilježena je na postaji A1, a najmanja na postaji N2 (Slika 4.1.20.). Postaja N2 se statistički značajno razlikuje od svih postaja, osim od postaje A3 ($H=27,2$, $p<0,001$). Među onečišćenim i referentnim postajama bilježi se značajna razlika u aktivnosti enzima glutation S-transferaze ($U=333$, $p=0,043$).



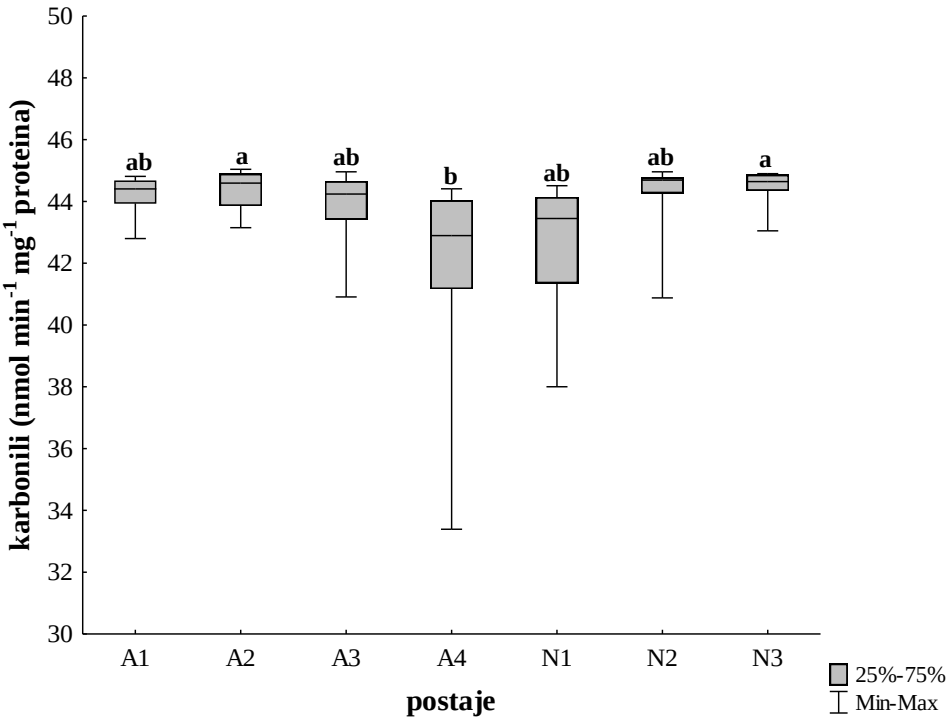
Slika 4.1.20. Aktivnosti enzima glutation S-transferaza (GST) mjerene spektrofotometrijski u tkivu volaka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih na različitim postajama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje) 2014. godine (medijan, donji/gornji kvartil i min./max. vrijednosti). Slova (a,b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

Aktivnost acetilkolinesteraze, kao i kod glutation reduktaze i glutation S-tranferaze, najniža je na postaji N2 (Slika 4.1.21.). Najveća aktivnost enzima zabilježena je na postajama A1, A3 i N3, od kojih se postaja N2 značajno statistički razlikuje ($H=20,5$, $p=0,002$). I kod acetilkolinesteraze se, kao i kod katalaze, ne bilježi značajna razlika u aktivnosti kad se uspoređuju sve referentne i sve onečišćene postaje ($U=364$, $p=0,058$).



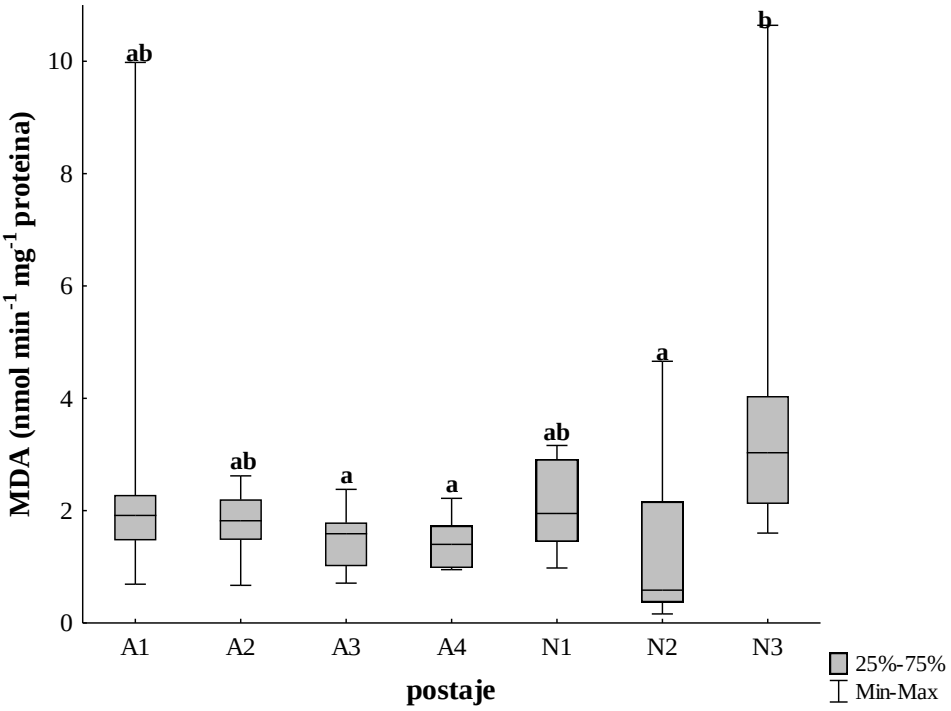
Slika 4.1.21. Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE) mjerene spektrofotometrijski u tkivu volaka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih na različitim postajama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje) 2014. godine (medijan, donji/gornji kvartil i min./max. vrijednosti). Slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

Najniže razine karbonila zabilježene su na postajama A4 i N1 (Slika 4.1.22.). Postaja A4 statistički se razlikuje od postaja A2 i N3, dok drugih razlika među postajama nema ($H=19,8$, $p=0,003$). Ne bilježi se značajna razlika u razini karbonila kad se uspoređuju sve referentne i sve onečišćene postaje ($U=22$, $p=0,386$).



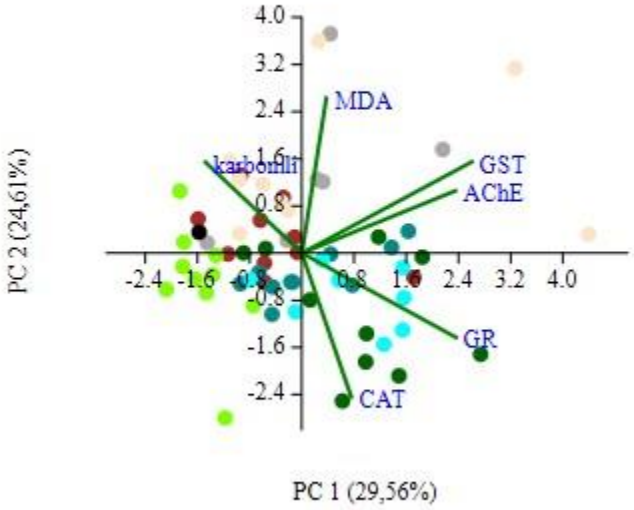
Slika 4.1.22. Sadržaj karbonila određen spektrofotometrijski u tkivu volaka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih na različitim postajama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje) 2014. godine (medijan, donji/gornji kvartil i min./max. vrijednosti). Slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

Najviše koncentracije malondialdehida izmjerene su na postaji N3, najniže na N2, dok su ostale postaje pokazale sličan raspon izmjerenih vrijednosti (Slika 4.1.23.). Postaja N3 statistički se značajno razlikuje od postaja A3, A4 i N2 ($H=19,8$, $p=0,003$). Koncentracije malondialdehida ne razlikuju se među onečišćenim i referentnim postajama ($U=397$, $p=0,146$).



Slika 4.1.23. Sadržaj malondialdehida (MDA) određen spektrofotometrijski u tkivu volaka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih na različitim postajama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje) 2014. godine (medijan, donji/gornji kvartil i min./max. vrijednosti). Slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među postajama ($p<0,05$).

Biomarkeri oksidativnog stresa podvrgnuti su PCA analizi. Prve dvije glavne komponente u PCA analizi biomarkera iz volaka uzorkovanih 2014. godine objasnile su 54,17% ukupne varijance, pri čemu je prva komponenta objasnila 29,56%, a druga 24,61% varijance (Slika 4.1.24.). Prva glavna komponenta je pokazala visoka faktorska opterećenja za glutation S-transferazu (0,57), glutation reduktazu (0,52) i acetilkolinesterazu (0,52). Druga glavna komponenta je pokazala visoka faktorska opterećenja za malondialdehide (0,58) i katalazu (0,53).



Slika 4.1.24. Rezultati PCA analize provedene na prikupljenim podatcima o biomarkerima za volke *Hexaplex trunculus* uzorkovane 2014. godine (A - onečišćene postaje, N – referentne postaje: A1 sivo, A2 smeđe, A3 tamno zeleno, A4 tamno plavo, N1 svjetlo zeleno, N2 svjetlo plavo, N3 svjetlo ružičasto)

Korelacija između biomarkera i masenog udjela TBT-a odnosno VDSI na jedinkama uzorkovanim 2014. godine analizirana je korištenjem Spearman rang analize. Analiza je pokazala slabu negativnu korelaciju sadržaja malondialdehida s masenim udjelom TBT-a u ostatku mekog tkiva volka ($r=-0,30$, $p<0,05$). Indeks imposeksa VDSI pozitivno korelira s aktivnosti glutation reduktaze ($r=0,26$, $p<0,05$) i negativno korelira sa sadržajem malondialdehida ($r=-0,31$, $p<0,05$).

4.2. Drugi dio istraživanja: 2015. godina

4.2.1. Morfometrijska obilježja, gonadosomatski indeks i indeks kondicije

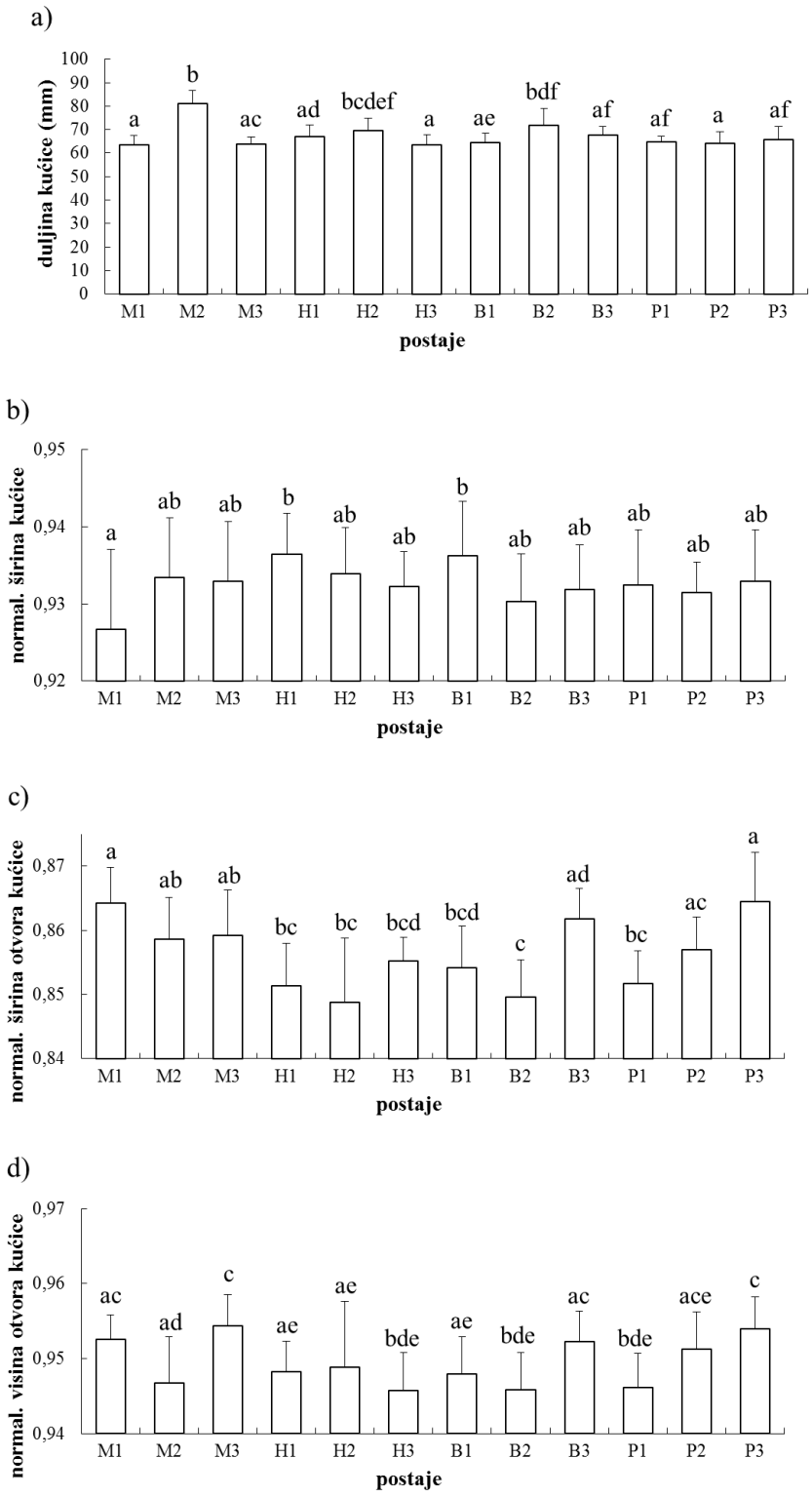
Tijekom 2015. godine ukupno je analizirano 475 volaka *Hexaplex trunculus*, 240 ženki i 235 mužjaka, prosječne duljine 65,8±8,0 mm. Najmanja jedinka uzorkovana je na postaji P2 i bila je duga 44,2 mm (Tablica 4.2.1.). Najveća jedinka uzorkovana je na postaji M2 i bila je duga 94,2 mm. Ženke su bile srednje duljine 67,3±6,7 mm i bile su značajno duže od mužjaka čija srednja duljina je bila 67,3±6,7 mm (U=21769, p<0,001). Među nekim od kategorija postaja uočene su statistički značajne razlike u duljini volaka po spolovima. Na intenzivnije onečišćenim postajama (nautičke marine i lučice) mužjaci su bili statistički značajno dulji nego na manje onečišćenim postajama (uvale koje se koriste sezonski: H=38,8, p=0,004; referentne postaje: H=38,8, p<0,001). Duljina ženki značajno se ne razlikuje među različitim kategorijama postaja, osim među referentnim postajama i uvalama koje se sezonski koriste gdje je duljina prvih značajno manja od duljine drugih (H=9,8, p=0,030). Promatrajući postaje pojedinačno, duljina ženki s nautičke marine M2 značajno je veća od duljina ženki s ostalih postaja, osim postaja H2 i B2 (H=89,4, p<0,001, Slika 4.2.1.a). Slično je i s mužjacima, duljine mužjaka s postaja M2 i B2 značajno su veće od duljine mužjaka s ostalih postaja, osim postaja H2 i H3 (H=136,9, p<0,001, Slika 4.2.2.a). I ovdje su sva morfometrijska obilježja normirana na duljinu jedinki (Slika 4.2.1. i Slika 4.2.2.).

Tablica 4.2.1. Duljina kućice jedinki vrste *Hexaplex trunculus* prikupljenih u 2015. godini prema postajama uzorkovanja: broj analiziranih jedinki (N), srednja vrijednost duljine kućice (sred. vrijed.), standardna devijacija (st. dev.), minimalna (min), i maksimalna (maks.) vrijednost.

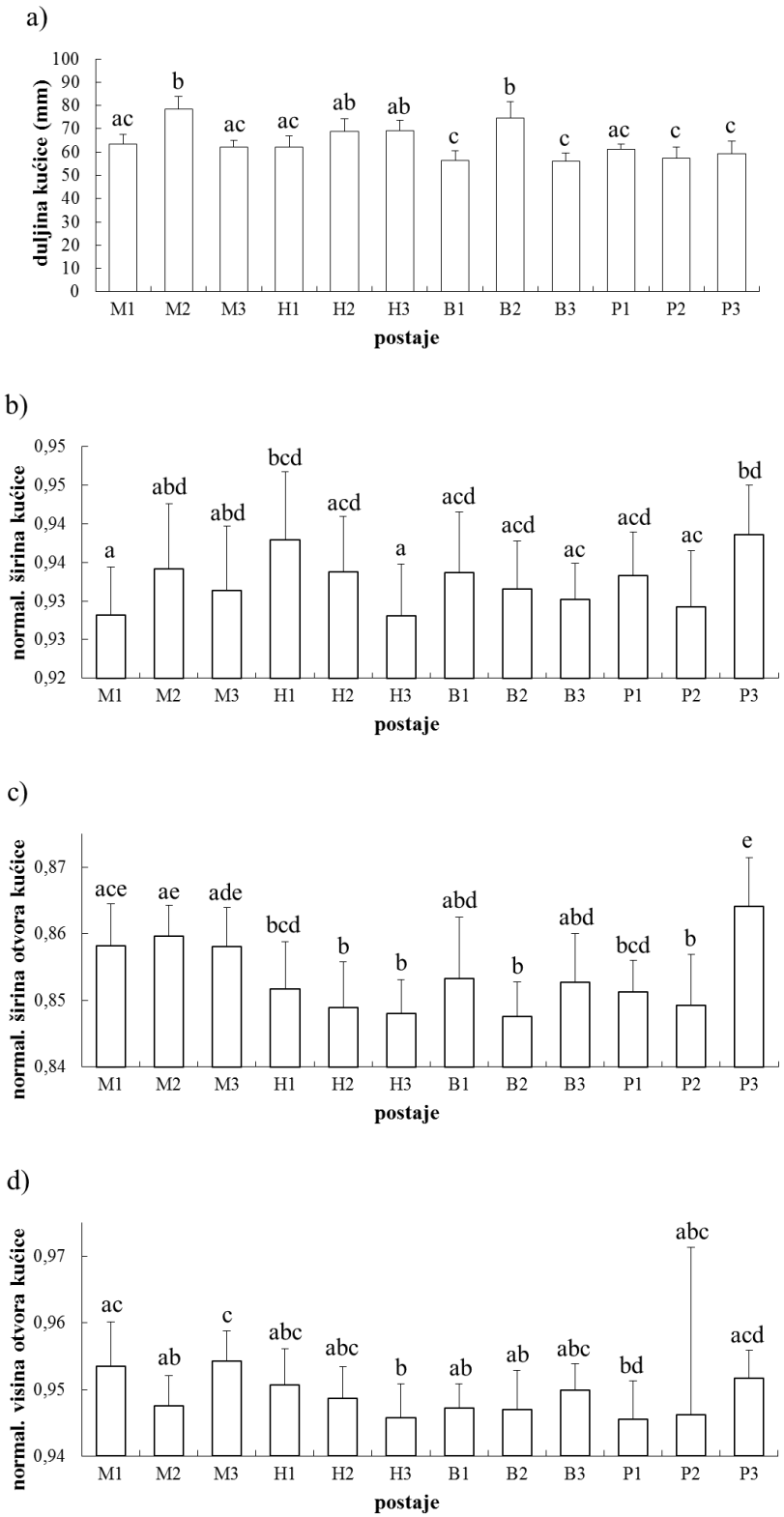
Kategorija	Postaja	N	TL (mm) sred.vrijed.	TL (mm) st.dev.	TL (mm) min.	TL (mm) maks.
Nautičke	M1	40	635	3,7	57,1	70,7
Marine	M2	40	79,7	4,6	72,7	94,2
	M3	40	63,0	7,7	55,9	72,3
Lučice	H1	40	64,7	6,3	52,2	76,6
	H2	40	69,3	5,4	59,7	82,9
	H3	40	66,3	5,9	55,6	75,7
Uvale koje se	B1	35	61,1	6,4	50,0	70,7
koriste sezonski	B2	40	73,3	7,0	60,2	87,3
	B3	40	61,8	7,7	47,5	75,1
Referentne	P1	40	63,1	4,2	52,0	69,9
Postaje	P2	40	60,7	7,2	44,2	76,0
	P3	40	62,5	6,2	51,3	79,1
Ukupno/sred.vrijed./ min./maks.		**475**	**65,8**	**8,0**	**44,2**	**94,2**

S obzirom na širinu kućice (TB'), ženke iz nautičkih marina se značajno razlikuju od onih iz lučica, dok među ostalim parovima kategorija postaja nema značajnih razlika ($H=7,3$, $p=0,063$). Širine kućice ženki s postaje M1 značajno su manje od onih s postaja H1 i B1 (Slika 4.2.1.b), dok među ostalim postajama nema značajnih statističkih razlika ($H=32,4$, $p<0,001$). Mužjaci se, među kategorijama postaja prema širini kućica, značajno ne razlikuju ($H=5,1$, $p=0,163$). Širine kućice mužjaka s postaja M1 i H3 značajno su manje od onih s postaja H1 i P3 (Slika 4.2.2.b), dok među ostalim postajama uglavnom nema značajnih statističkih razlika ($H=43,3$, $p<0,001$). Širine otvora kućice ženki iz nautičkih marina značajno su veće od ostalih kategorija postaja, a značajno veći otvor kućice imaju i ženke s referentnih postaja u odnosu na one iz lučica ($H=52,4$, $p<0,001$). Usporedna analiza pojedinačnih postaja pokazuje da su širine otvora kućice ženki s postaja M1 i P3 značajno veće od onih iz lučica i uvala koje se sezonski koriste, osim uvale B3, dok se kod ostalih postaja uglavnom značajno ne razlikuju ($H=97,6$, $p<0,001$, Slika 4.2.1.c). Kod mužjaka su širine otvora kućice među kategorijama uglavnom značajno različite ($H=52,4$, $p<0,001$). Kod visine otvora kod ženki unutar svake od kategorija postaja postoje značajne razlike među određenim postajama, a slično je i kod mužjaka. Analiza razlika visine otvora među kategorijama pokazuje da je značajna razlika među nautičkim marinama i lučicama odnosno uvalama koje se sezonski koriste pri čemu je visina otvora kućice veća kod jedinki iz nautičkih marina kako kod ženki ($H=21,1$, $p<0,001$) tako i kod mužjaka ($H=13,6$, $p=0,003$). Također, kod ženki iz lučica visine otvora kućice su značajno veće nego kod onih s referentnih postaja ($H=21,1$, $p<0,001$).

Kod ženki duljina kućice korelira sa širinom kućice ($r=-0,13$, $p<0,05$) i visinom otvora kućice ($r=-0,16$, $p<0,05$), te širina otvora kućice korelira sa širinom kućice ($r=0,15$, $p<0,05$) i visinom otvora kućice ($r=0,49$, $p<0,001$). Kod mužjaka duljina kućice korelira samo s visinom otvora kućice ($r=-0,15$, $p<0,05$), te širina otvora kućice korelira sa širinom kućice ($r=0,35$, $p<0,001$) i visinom otvora kućice ($r=0,35$, $p<0,001$).

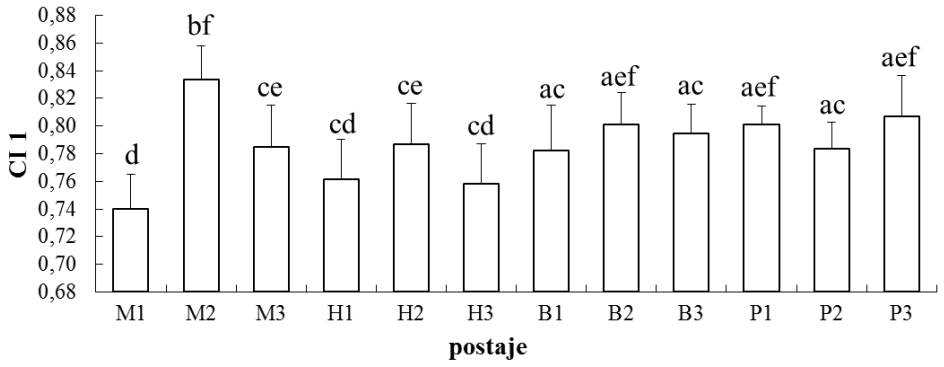


Slika 4.2.1. Morfometrijska obilježja (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2015. godine. Podatci za širinu kućice (TB'), širinu otvora kućice (AW) i visinu otvora kućice (AL2) logaritamski su transformirani i standardizirani na duljinu kućice - normalizirani. Različita slova (a, b, c, d, e, f) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.

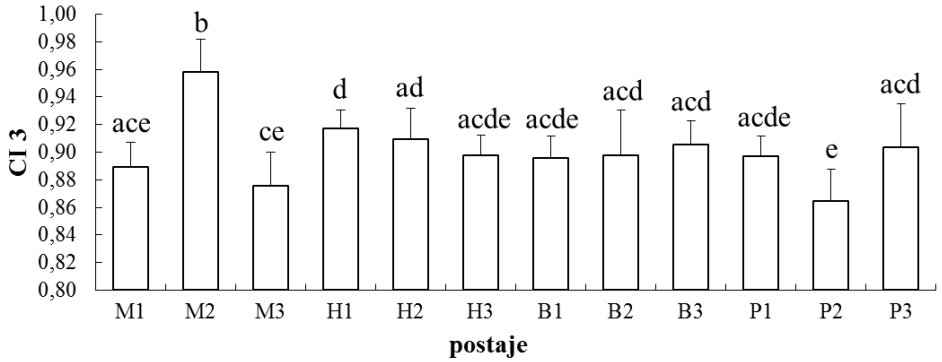


Slika 4.2.2. Morfometrijska obilježja (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2015. godine. Podatci za širinu kućice (TB'), širinu otvora kućice (AW) i visinu otvora kućice (AL2) logaritamski su transformirani i standardizirani na duljinu kućice - normalizirani. Različita slova (a, b, c, d, e) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.

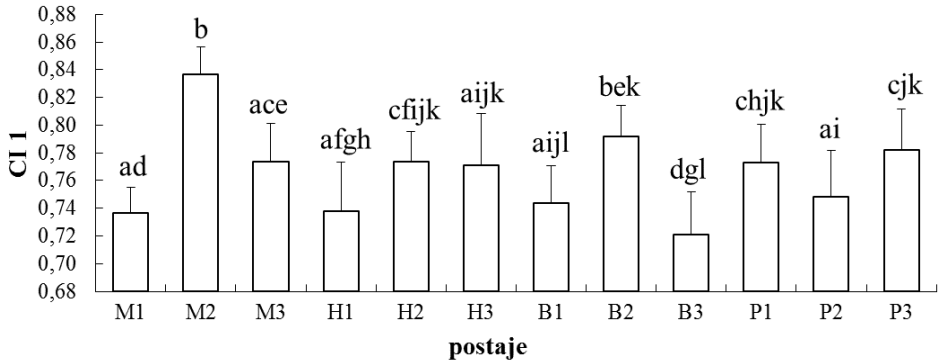
Indeks kondicije 1 (CI 1 = ukupna masa mekog tkiva/duljina kućice) bio je i kod ženki (Slika 4.2.3.) i kod mužjaka (Slika 4.2.5.) najveći na istoj postaji, postaji M2. Ista postaja ima i najveći indeks kondicije 3 (CI 3 = masa kućice/duljina kućice) kod ženki (Slika 4.2.4.) i mužjaka (Slika 4.2.6.). Najmanji CI 1 kod ženki je na postaji M1, a kod mužjaka na postaji B3. Najmanji CI 3 bio je na postaji P2 i kod ženki i kod mužjaka. Indeksi CI 1 i CI 3 međusobno koreliraju i kod ženki ($r=0,41$, $p<0,001$) i kod mužjaka ($r=0,59$, $p<0,001$). Usporedbom kategorija postaja kod mužjaka je utvrđena značajna statistička razlika indeksa CI 1 među nautičkim lukama i uvalama koje se sezonski koriste ($H=10,6$, $p=0,011$), odnosno kod ženki među nautičkim lukama i lučicama ($H=24,2$, $p=0,025$), lučicama i uvalama koje se sezonski koriste ($p<0,001$) te lučicama i referentnim postajama ($p<0,001$). Indeks CI 3 značajno je veći kod ženki iz lučica nego kod onih s referentnih postaja ($H=15,5$, $p<0,001$). Isti indeks kod mužjaka značajno je veći u nautičkim lukama nego na referentnim postajama ($H=23,7$, $p<0,001$) te je značajno veći u lučicama nego u uvalama koje se sezonski koriste ($p=0,006$) i na referentnim postajama ($p<0,001$).



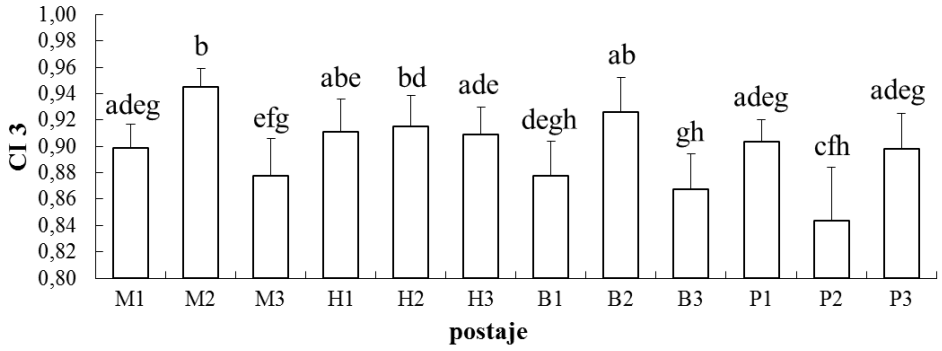
Slika 4.2.3. Indeks kondicije CI 1 = ukupna masa tkiva/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2015. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e, f) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.



Slika 4.2.4. Indeks kondicije CI 3 = masa kućice/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) ženki populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2015. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.



Slika 4.2.5. Indeks kondicije CI 1 = ukupna masa mekog tkiva/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2015. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.



Slika 4.2.6. Indeks kondicije CI 3 = masa kućice/duljina kućice (srednja vrijednost + standardna devijacija) mužjaka populacija volka *Hexaplex trunculus* uzorkovanih 2015. godine. Svi podatci logaritamski su transformirani. Različita slova (a, b, c, d, e, f, g, h) označavaju statistički značajno različite postaje ($p<0,05$). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.

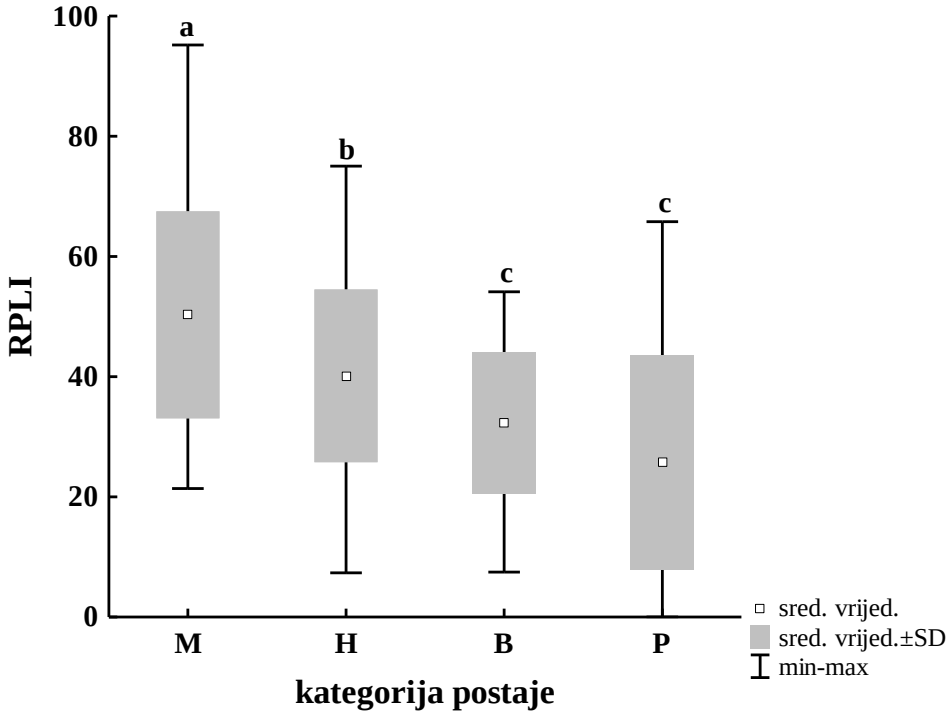
4.2.2. Imposeks

Imposeks je bio prisutan kod svih ženki volka *Hexaplex trunculus* na svim postajama istraživanim 2015. godine osim na postaji P3 gdje je udio ženki s imposeksom iznosio 90% (Tablica 4.2.2.). Kao i u istraživanju provedenom 2014. godine, na postaji P3 koja se jedina nalazi unutar zaštićenog područja prirode zabilježene su najmanje vrijednosti indeksa imposeksa pri čemu je najviši zabilježeni stadij imposeksa VDS iznosio 3. Populacije volka u nautičkim lukama imale su najizraženiji imposeks, RPSI se kretao od 6,7% do 20,4%, a VDSI je bio veći od 4,7. Visoke razine imposeksa zabilježene su i u lučicama, posebno na lokaciji H3. Kod populacija iz sezonski korištenih uvala također su zabilježene umjerene do visoke razine imposeksa, no ipak nešto manjeg stupnja nego kod populacija u marinama i lučicama. Sterilne ženke (VDS=5) zabilježene su na svim istraživanim lokacijama osim na tri lokacije: lučica H2, uvala koja se sezonski koristi B3 i referentna lokacija P3.

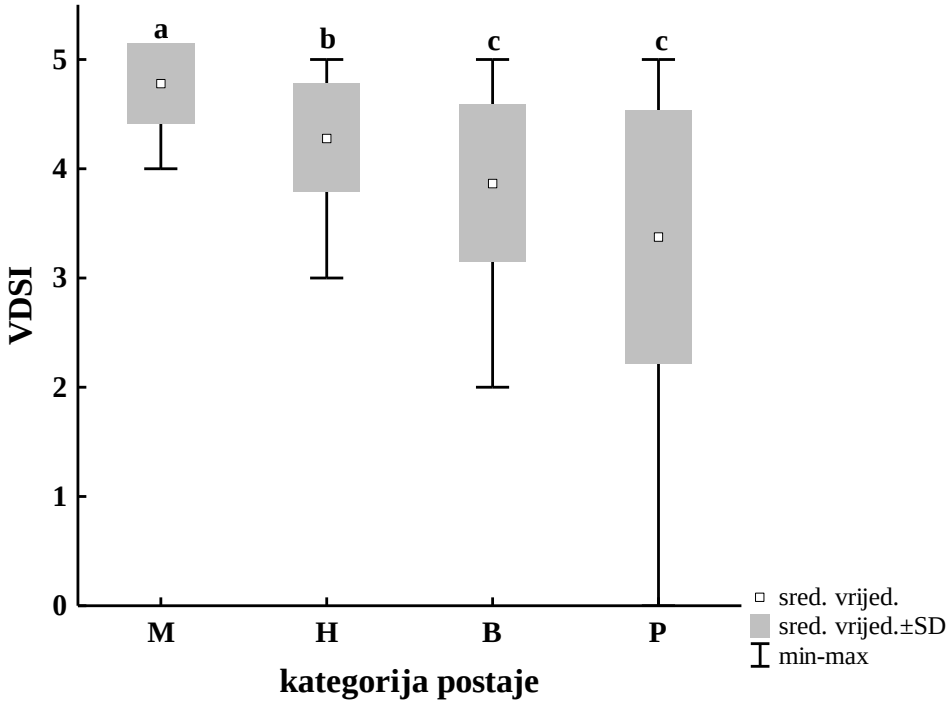
Indeksi imposeksa (RPLI, VDSI) statistički su značajno veći kod populacija iz nautičkih marina u odnosu na populacije iz lučica te uvala koje se sezonski koriste i referentnih postaja (RPLI: $H=58,1$, $p<0,001$; VDSI: $H=107,4$, $p<0,001$; Slika 4.2.7. i Slika 4.2.8.). Nije utvrđena značajna razlika među postajama koje se sezonski koriste i referentnim postajama odnosno onima koje se rijetko koriste. Također, indeksi imposeksa značajno se razlikuju među lokacijama unutar iste kategorije brodske aktivnosti, osim kod lučica te indeksa VDSI kod nautičkih marina. Populacija s referentne lokacije P3, jedine koja spada u zaštićena područja prirode, ima značajno manji indeks RPLI od svih drugih lokacija ($p<0,007$). Usporedbom pojedinačnih postaja, bez obzira na kategoriju, postaja P3 se prema indeksu VDSI značajno razlikuje od ostalih postaja, osim od postaja B2 i B3 ($H=133$, $p\leq0,041$). Postaja H1 značajno se razlikuje samo od postaja B2, B3 i P3 ($H=133$, $p\leq0,033$).

Tablica 4.2.2. Pregled rezultata istraživanja imposeksa iz 2015. godine na vrsti *Hexaplex trunculus* (duljina kućice, postotak ženki s imposeksom, postotak sterilnih ženki, duljina penisa ± standardna devijacija, indeks relativne duljine penisa (RPLI), indeks relativne veličine penisa (RPSI), vas deferens indeks (VDSI) ± standardna devijacija). M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P - referentne postaje.

Postaja	Spol	Br. jedinki	Duljina kućice (mm)	Ženke s imposeksom (%)	Sterilne ženke (%)	Duljina penisa (mm)	RPLI (%)	RPSI (%)	VDSI
M_1	M	20	63,4±3,5			10,6±2,2			
	F	20	63,5±4,1	100	70	5,5±1,7	51,64	13,78	4,7±0,4
M_2	M	20	78,3±2,8			14,5±4,1			
	F	20	81,0±5,6	100	80	5,9±2,4	40,56	6,67	4,9±0,3
M_3	M	20	62,0±4,3			14,8±2,0			
	F	20	63, 9±2,9	100	60	8,7±2,3	58,64	20,14	4,8±0,4
H_1	M	20	62,3±6,8			12,2±2,8			
	F	20	67,1±4,8	100	35	4,9±1,7	39,78	6,28	4,6±0,4
H_2	M	20	69,0±5,6			13,3±2,6			
	F	20	69,7±5,3	100	0	6,4±1,5	48,08	11,09	4,1±0,3
H_3	M	20	69,2±6,0			13,6±3,4			
	F	20	63,5±4,3	100	20	4,4±1,9	32,55	3,44	4,2±0,6
B_1	M	15	56,5±6,3			12,2±2,7			
	F	20	64,5±3,9	100	5	4,1±1,2	33,53	3,77	4,0±0,6
B_2	M	20	74,5±6,8			13,4±2,4			
	F	20	72,0±7,0	100	10	4,1±2,0	31,01	2,98	3,7±1,0
B_3	M	20	56,0±6,2			10,8±2,3			
	F	20	67, 6±3,7	100	0	3,5±1,1	32,28	3,35	3,9±0,3
P_1	M	20	61,3±4,9			11,7±4,9			
	F	20	64,9±2,3	100	5	4,3±1,9	36,88	5,01	3,9±0,7
P_2	M	20	57,3±7,6			13,1±1,9			
	F	20	64,2±4,9	100	5	4,4±1,6	33,60	3,81	4,1±0,3
P_3	M	20	59,3±5,3			14,3±2,3			
	F	20	65,7±5,5	90	0	0,9±0,3	6,60	0,03	2,2±1,2



Slika 4.2.7. Usporedba indeksa relativne duljine penisa (RPLI) volaka *Hexaplex trunculus* između različitih kategorija postaja kategoriziranih prema brodskoj aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne postaje) u 2015. godini. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajno različite postaje (p<0,05).



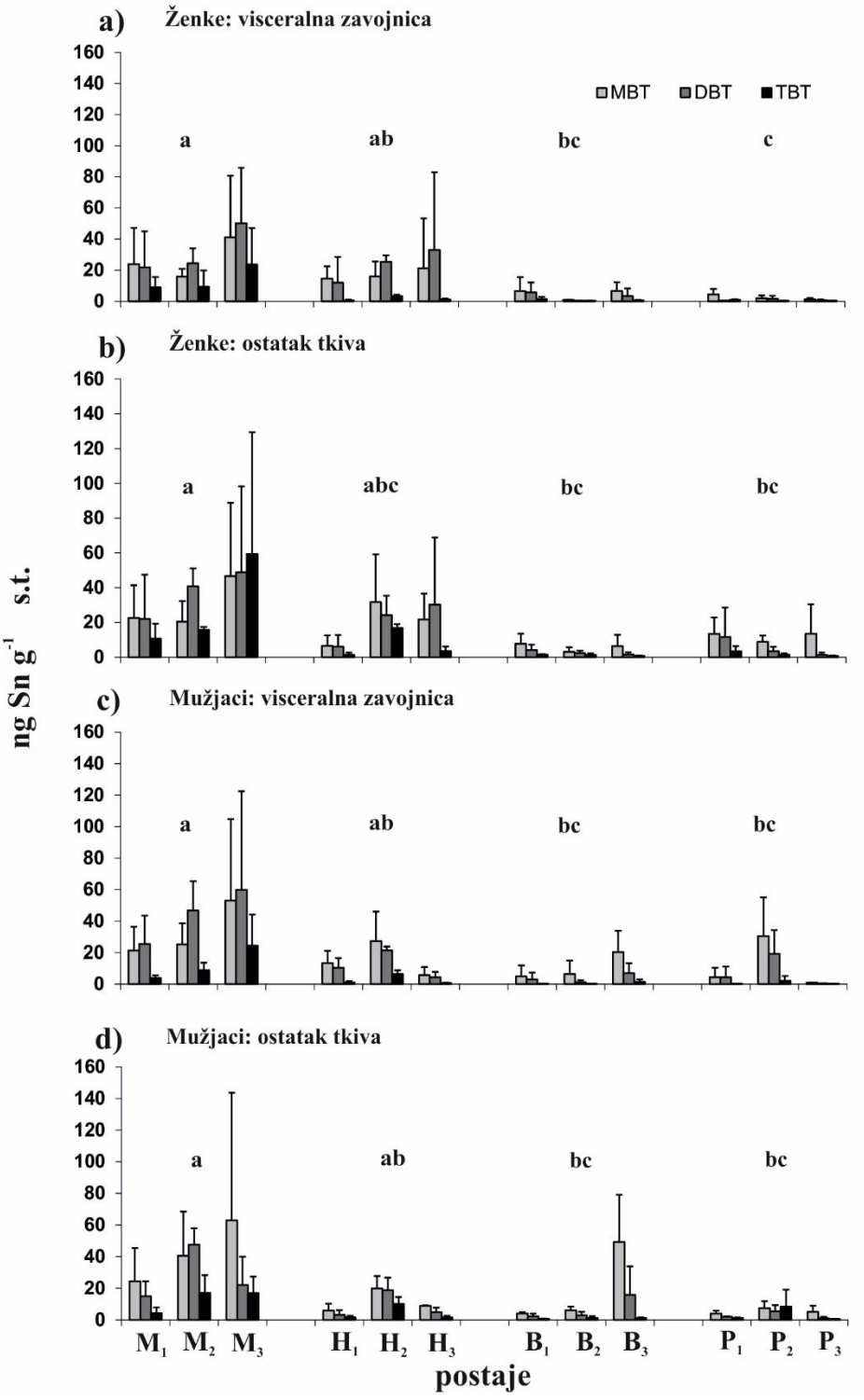
Slika 4.2.8. Usporedba indeksa vas deferensa (VDSI) volaka *Hexaplex trunculus* između različitih kategorija postaja kategoriziranih prema brodskoj aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne lokacije) u 2015. godini. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajno različite postaje (p<0,05).

4.2.3. Butilkositrovi spojevi u tkivima volka *Hexaplex trunculus* i površinskom sedimentu

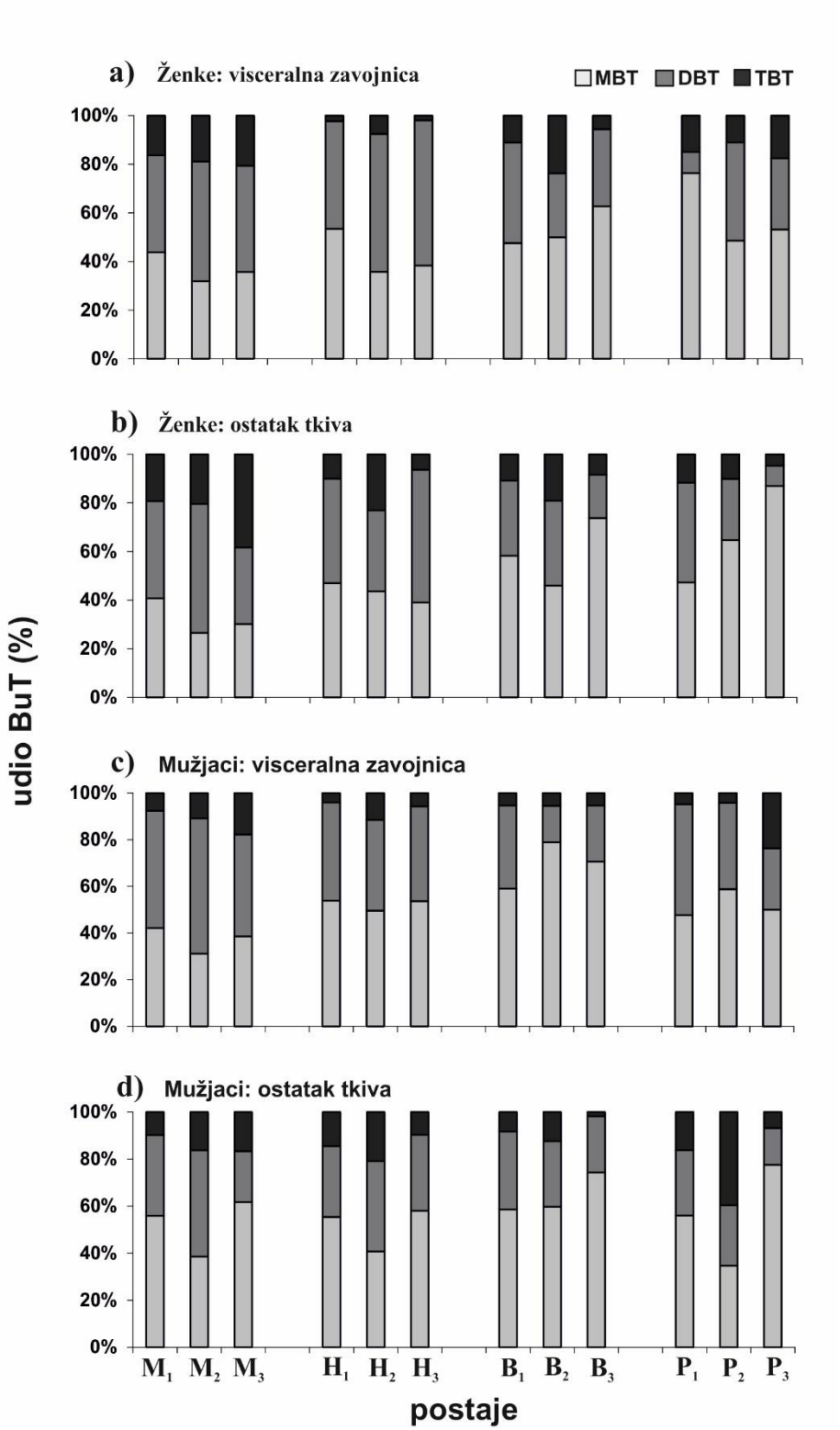
Maseni udjeli butilkositrovih spojeva (monobutilkostra MBT, dibutilkositra DBT i tributilkositra TBT) u tkivima volaka *Hexaplex trunculus* sakupljenih na 12 postaja u srednjem dijelu istočne jadranske obale analizirane su posebno za visceralnu zavojnicu (probavna žlijezda i gonade) i posebno za ostatak tkiva, odvojeno za ženke i mužjake. Rezultati analiza prikazani su na Slici 4.2.9. Srednji ukupni maseni udio ∑BuT (∑BuT=TBT+DBT+MBT) kod ženki u tkivu visceralne zavojnice u nautičkim marinama (73,3±9,3 ng Sn g^{-1} s.t.) bio je 2 puta veći od onog u lučicama (42,5±11,2 ng Sn g^{-1} s.t.), 8 puta veći od onog u uvalama koje se sezonski koriste (8,9±2,0 ng Sn g^{-1} s.t.) i 18 puta veći od onog na referentnim postajama (4,1±1,1 ng Sn g^{-1} s.t.). U ostatku tkiva ženki srednji maseni udio ∑BuT u nautičkim marinama (95,7±4,6 ng Sn g^{-1} s.t.) bio je 2 puta veći od onog u lučicama (47,4±7,4 ng Sn g^{-1} s.t.), 10 puta veći od onog u uvalama koje se sezonski koriste (9,5±2,3 ng Sn g^{-1} s.t.) i 5 puta veći od onog na referentnim postajama (19,2±5,1 ng Sn g^{-1} s.t.). Raspodjela masenog udjela BuT u mužjaka slična je onoj u ženki, a razlike među kategorijama lokacija su manje izražene. Najviši maseni udio ∑BuT izmjeren je u uzorcima iz nautičke marine M3 u svim vrstama tkiva, pri čemu je na ovoj lokaciji maseni udio u ostatku tkiva mužjaka skoro jednak onom na lokaciji M2. Na nekoliko lokacija sezonske i rijetke brodske aktivnosti maseni udio ∑BuT bio je vrlo mali (<6,0 ng Sn g^{-1} s.t.) ili čak ispod granice detekcije i to uglavnom u tkivima ženki (P_1, P_2, P_3, B_2). Izmjereni maseni udjeli TBT-a u pojedinim uzorcima bili su općenito mali (<15 ng Sn g^{-1} s.t.), osim u nautičkim marinama gdje su se kretali od 5 do 60 ng Sn g^{-1} s.t. U uvalama koje se sezonski koriste i na referentnim postajama vrijednosti za TBT su uvijek bile blizu ili ispod granice detekcije, a udio TBT-a je najčešće bio niži od udjela DBT-a i MBT-a (Slika 4.2.10.). Uzimajući u obzir sve vrste tkiva TBT je u ∑BuT imao udio 2-40%, a DBT 8-60%. Monobutilkositar je najčešće predstavljao dominantan butilkositar s udjelom u ∑BuT u vrijednosti 27-87%.

Kruskal-Wallisovim testom potvrđeno je da su maseni udjeli ∑BuT i TBT bili značajno veći u populacijama iz nautičkih marina u odnosu na one iz uvala koje se sezonski koriste i referentnih postaja i to uzimajući u obzir sve vrste tkiva ženki $p<0,05$ i mužjaka $p<0,01$. Značajnih razlika nije bilo među nautičkim marinama i lučicama kao ni među lokacijama koje se sezonski ili rijetko koriste. Također treba napomenuti da maseni udjeli butilkositrovih spojeva u različitim tkivima mužjaka i ženki nisu bili značajno različiti unutar populacija s lokacija iste kategorije brodskih aktivnosti. Iznimka je maseni udio TBT-a u ostatku tkiva ženki među lokacijama H1 i H2.

Statistički značajna korelacija ($p<0,05$) utvrđena je između TBT-a i produkata njegove razgradnje DBT-a i MBT-a u tkivu visceralne zavojnice (TBT_{vc} vs DBT_{vc}, r=0,76; TBT_{vc} vs MBT_{vc}, r=0,70; DBT_{vc} vs MBT_{vc}, r=0,85) i u ostatku mekog tkiva (TBT_{ot} vs DBT_{ot}, r=0,85; TBT_{ot} vs MBT_{ot}, r=0,67; DBT_{ot} vs MBT_{ot}, r=0,77). Također, među svim butilkositrovim spojevima istog tipa, ali iz različitih tkiva, utvrđene su statistički značajne korelacije ($p<0,05$; TBT_{vc} vs TBT_{ot}: r=0,79; DBT_{vc} vs DBT_{ot}: r=0,69; MBT_{vc} vs MBT_{ot}: r=0,52).



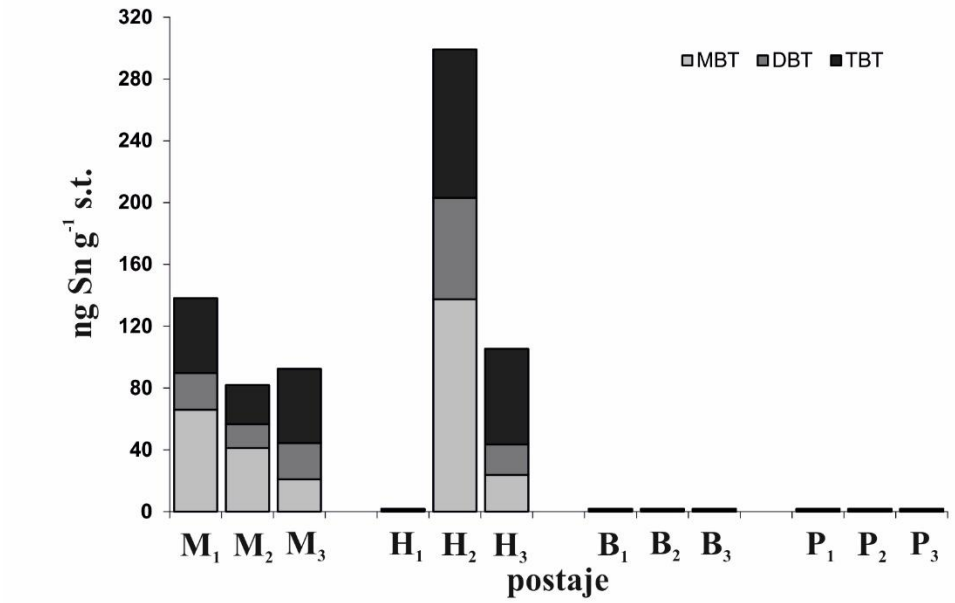
Slika 4.2.9. Prosječni maseni udjeli butilkositrovih spojeva (monobutilkostra MBT, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u različitim vrstama tkiva ženki i mužjaka (tkivo visceralne zavojnice i ostatak tkiva) vrste *Hexaplex trunculus* sakupljenih na 12 postaja različite kategorije s obzirom na brodske aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne lokacije) u 2015. godini. Srednje vrijednosti prikazane su s pratećom standardnom devijacijom: srednja vrijednost + standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajno različite kategorije postaja (a, b, c) s obzirom na ukupne butilkositrove spojeve ∑BuT ($p<0,05$).



Slika 4.2.10. Udio svakog butilkositrovog spoja (monobutilkostra MBT, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u zbroju butilkositrovih spojeva (∑BuT) u različitim tkivima ženki i mužjaka (tkivo visceralne zavojnice i ostatak tkiva) vrste *Hexaplex trunculus* sakupljenih na 12 lokacija različite brodske aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne lokacije) u 2015. godini.

Prostorne varijacije u masenim udjelima butilkositrovih spojeva u sedimentima sakupljenim na 12 postaja središnjeg hrvatskog dijela jadranske obale u 2015. godini prikazani su

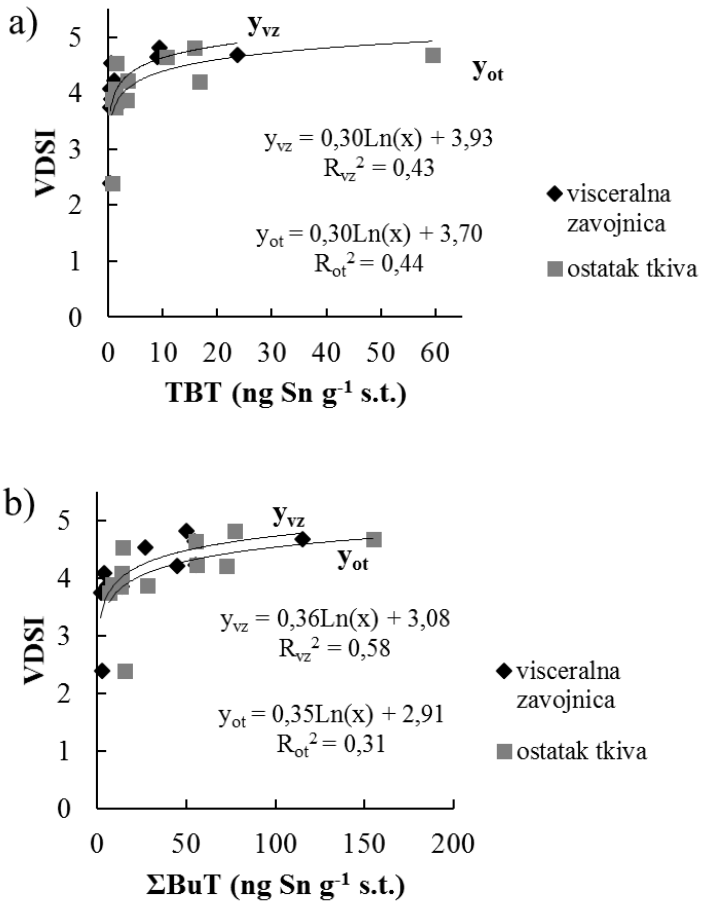
na Slici 4.2.11. Rezultati ukazuju na izrazite razlike među lokacijama s različitim brodskim aktivnostima. Ipak, zbog nedostatka replika na svakoj lokaciji te razlike nisu statistički značajne. Srednji maseni udjeli ∑BuT u marinama i lučicama bili su usporedivi (104,2 u marinama prema 135,5 ng Sn g^{-1} u lučicama), dok su u uvalama koje se sezonski koriste i na referentnim lokacijama bili ispod granice detekcije. Najviši maseni udio ∑BuT bio je u lučici H2 (299,1 ng Sn g^{-1}), a najniži u nautičkoj marini M_2 (81,9 ng Sn g^{-1}). Maseni udio TBT-a pratio je distribuciju BuT.



Slika 4.2.11. Maseni udjeli butilkositrovih spojeva (monobutilkostra MBA, dibutilkositra DBT, tributilkositra TBT) u sedimentima sakupljenim na 12 postaja različite brodske aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne lokacije) u 2015. godini.

4.2.4. Povezanost imposeksa i masenog udjela butilkositrovih spojeva kod vrste *Hexaplex trunculus*

Usporedba masenog udjela TBT-a i ∑BuT sa stadijima VDS pokazala je nagli porast VDSI već na vrlo niskim razinama TBT-a, pa se najviši stadiji VDS (VDS>4) javljaju već kod masenih udjela TBT-a nižim od 5 ng Sn g^{-1} (Slika 4.2.12.). Stadij VDS=5 odgovara srednjoj vrijednosti masenog udjela TBT-a od 4,3 ng Sn g^{-1} u tkivu visceralne zavojnice odnosno masenom udjelu ∑BuT od 41,6 ng Sn g^{-1}.



Slika 4.2.12. Odnos VDSI (a) i masenog udjela tributilkositra (TBT) (b) i masenog udjela ukupnih butilkositrovih spojeva (∑BuT) u tkivu visceralne zavojnice (vz) i ostatku tkiva (ot) vrste *Hexaplex trunculus* prema istraživanjima provedenim u 2015. godini.

Statistički značajne korelacije ostvarene su između različitih indeksa imposeksa (RPLI, RPSI, VDSI) i masenih udjela TBT-a i ∑BuT u obje analizirane vrste tkiva (Tablica 4.2.3.). Korelacije u visceralnoj zavojnici nešto su značajnije između indeksa imposeksa i masenog udjela ∑BuT, dok su u ostatku tkiva značajnije korelacije s TBT-om. Značajne korelacije također su uočene između različitih indeksa imposeksa (VDSI vs RPLI, r=0,67; VDSI vs RPSI, r=0,59; RPLI vs RPSI, r=0,93; p<0,001).

Tablica 4.2.3. Spearman rang korelacija između pojedinih različitih indeksa imposeksa i masenog udjela butilkositrovih spojeva (TBT, ∑BuT) u tkivu visceralne zavojnice i ostatku tkiva volka *Hexaplex trunculus*. Primijenjene su različite razine vjerojatnosti p (*** p<0,001; ** p<0,01).

	VDSI vs ∑BuT	RPLI vs ∑BuT	RPSI vs ∑BuT	VDSI vs TBT	RPLI vs TBT	RPSI vs TBT
tkivo	***	***	***	***	***	***
visc. zavoj.	0,65	0,70	0,59	0,58	0,66	0,59
ostatak	**	**	**	***	***	***
tkiva	0,48	0,52	0,48	0,58	0,64	0,60

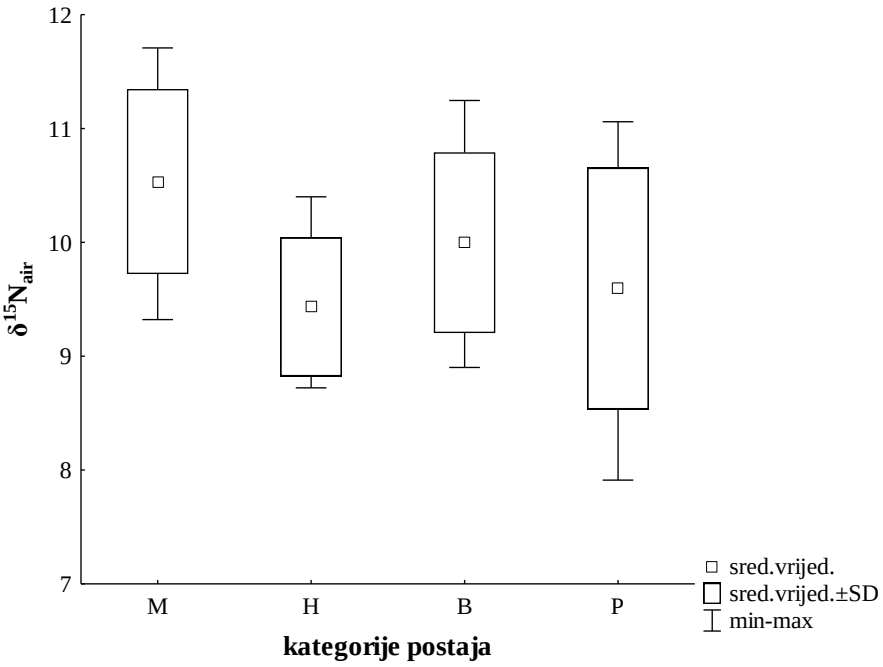
4.2.5. Stabilni izotopi

Sadržaj stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) u uzorcima mišića volka *Hexaplex trunculus* prikupljenim na 12 postaja uzorkovanja varirao je od 7,9 od 11,7 ‰ (9,89±0,91 ‰). Najniža srednja vrijednosti zabilježena je za uzorke prikupljene na području Malostonskog zaljeva (P3) (8,31±0,42 ‰, Slika 4.2.13.). Ukupno 5 uzoraka je imalo $\delta^{15}N_{air}$ vrijednosti veće od 11‰, dva uzorka iz Milne (M2), te po jedan uzorak iz Biograda (M3), Lastova (B2) i Brsečina (P1). Prikupljeni podatci imali su homogene varijance (Levene test, p=0,832). Nije bilo statistički značajne razlike u sastavu stabilnih izotopa dušika s obzirom na kategoriju postaja (p=0,362, Tablica 4.2.4.), dok je statistički značajna razlika utvrđena između postaja (p=0,001). Značajne razlike utvrđene su između ukupno 8 parova postaja. Uzorci iz Malog Stona (P3) značajno su se razlikovali od uzoraka iz Milne (M2), Biograda (M3), Zatona (B1), Lastova (B2) i Brsečina (P1). Nadalje, značajno su se razlikovali uzorci iz Milne (M2) od uzoraka iz Baške Vode (H1) i Crvene Luke (B3).

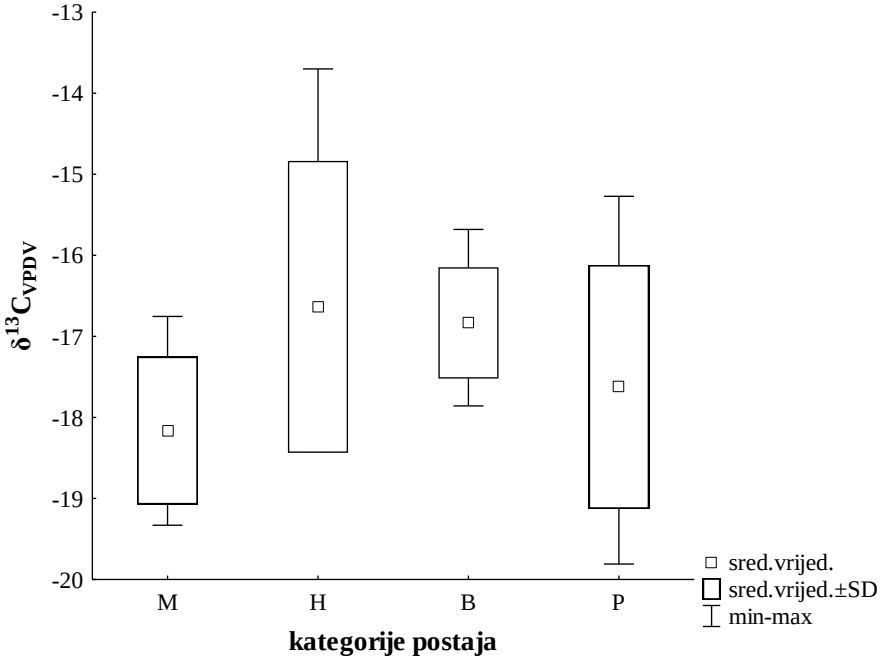
Tablica 4.2.4. Rezultati ugniježđene analize varijance (ANOVA) $\delta^{15}N_{air}$ vrijednosti (‰) u mišićnom tkivu volaka *Hexaplex trunculus* s obzirom na kategoriju i postaju uzorkovanja

Izvor	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p**
Kategorija	3	6,505	2,168	1,23	0,362
Postaja (kategorija)	8	14,151	1,769	5,24	0,001
Greška	24	8,107	0,338		
Ukupno	35				

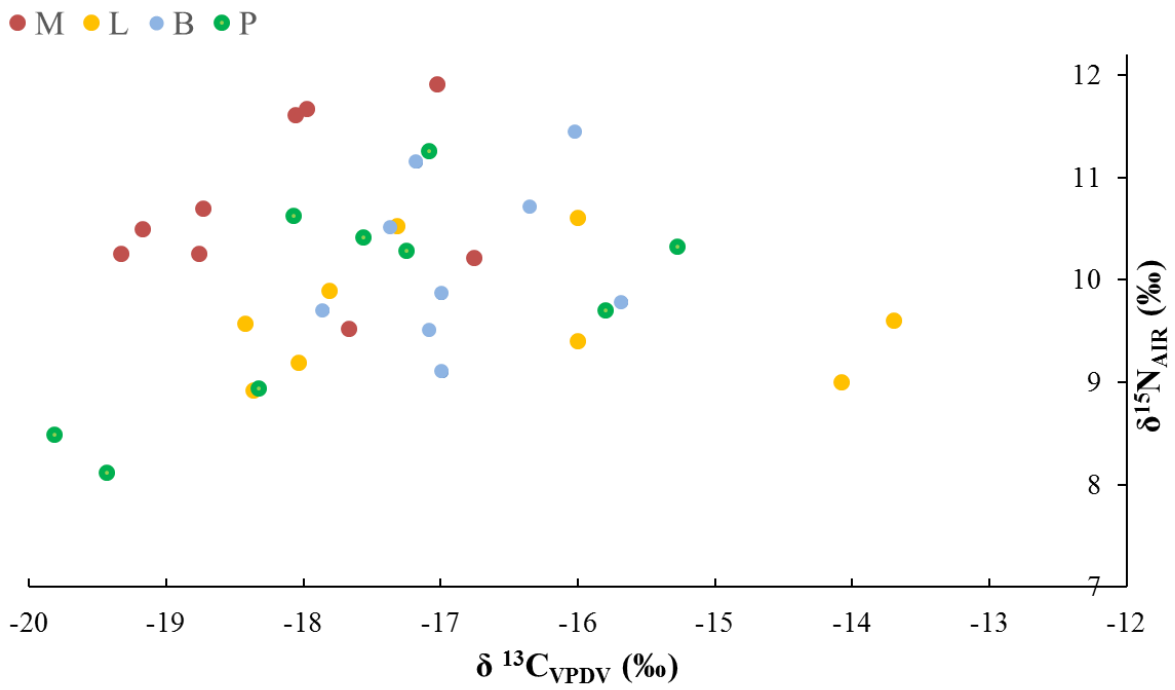
Vrijednosti stabilnog izotopa ugljika bile su u rasponu od -19,8 do -13,7‰ (-17,32±1,39‰; Slika 4.2.14.). Kao i vrijednosti stabilnog izotopa dušika, nije bilo značajne razlike s obzirom na kategoriju brodskog prometa (H=6,8, p=0,079). Utvrđena je statistički značajna razlika s obzirom na postaje uzorkovanja (H=22,4, p=0,021). Raspodjela vrijednosti $\delta^{15}N_{air}$ i $\delta^{13}C_{VPDV}$ s obzirom na kategoriju prikazuje osipanje podataka, osobito za uzorke s referentnih postaja (Slika 4.2.15.).



Slika 4.2.13. Usporedba sadržaja stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) u uzorcima mišića volka *Hexaplex trunculus* između različitih kategorija postaja kategoriziranih prema brodskoj aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne postaje) u 2015. godini.



Slika 4.2.14. Usporedba sadržaja stabilnih izotopa ugljika ($\delta^{13}C_{VPDV}$) u uzorcima mišića volka *Hexaplex trunculus* između različitih kategorija postaja kategoriziranih prema brodskoj aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne postaje) u 2015. godini.



Slika 4.2.15. Odnos sadržaja stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) i stabilnih izotopa ugljika ($\delta^{13}C_{VPDV}$) u uzorcima mišića volka *Hexaplex trunculus* iz različitih kategorija postaja kategoriziranih prema brodskoj aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne postaje).

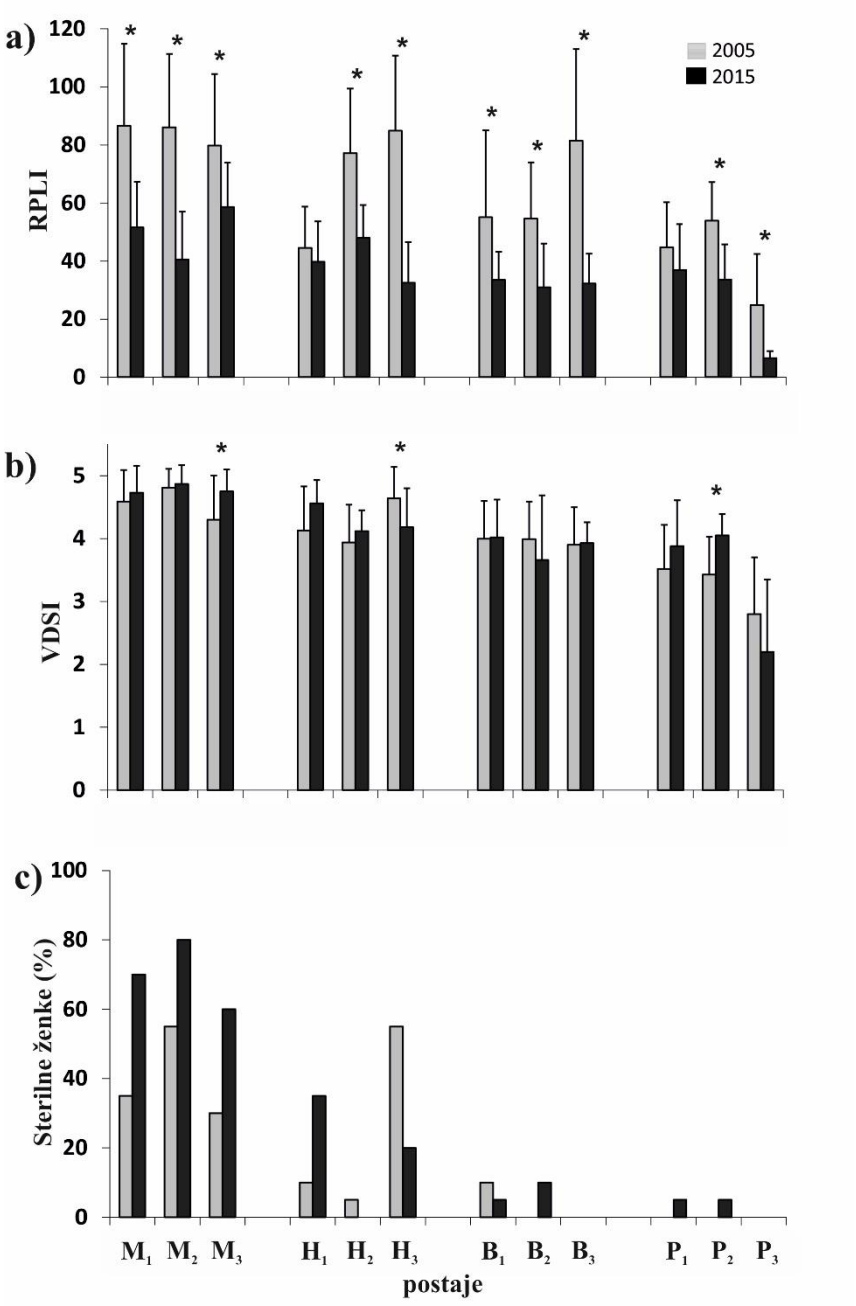
5. RASPRAVA

5.1. Imposeks volka *Hexaplex trunculus* i onečišćenost TBT-om u srednjem dijelu istočne obale Jadrana

U istraživanjima provedenim u proljeće 2014. i 2015. godine u hrvatskom dijelu srednjeg Jadrana na vrsti *Hexaplex trunculus* utvrđena je prisutnost imposeksa na svim istraživanim postajama i to s vrlo visokim udjelom ženki s imposeksom, 88% i više (tablice: 4.1.2., 4.2.2.). Budući da se pojavnost imposeksa najčešće povezuje s brodskim prometom, odnosno organokositrovim spojevima koji se otpuštaju iz protuobraštajnih premaza brodova, istraživane postaje podijeljene su u kategorije ovisno o razini brodskog prometa. Usporedbom različitih kategorija postaja potvrđeno je da su na postajama s intenzivnijim brodskim prometom indeksi imposeksa kod volka značajno veći od onih sa slabijim brodskim prometom (slike: 4.1.11., 4.1.12., 4.2.7., 4.2.8.). Među 19 istraživanih postaja od Zadra do Dubrovnika, jedinke volka bez imposeksa zabilježene su samo na tri referentne postaje (tablice: 4.1.2., 4.2.2.) od koji se jedna nalazi u Malostonskom zaljevu (N1, P3) koji predstavlja zaštićeni dio prirode, a druge dvije u uzgajalištu školjkaša u Marini kraj Trogira (N2) te uz plažu na južnoj strani otoka Čiova (N3).

S obzirom da je glavni cilj istraživanja provedenog u 2015. godini bio upravo analiza učinkovitosti zabrane korištenja TBT-a u protuobraštajnim bojama, istraživanje je provedeno 10 godina nakon početka zabrane korištenja TBT-a na istim postajama na kojima su istraživanja u 2005. godini proveli Prime i suradnici (2006). Statistička usporedba rezultata iz 2005. i 2015. godine (Slika 5.1.1.) za različite indekse imposeksa pokazala je različite trendove u desetogodišnjem razdoblju. Na Slici 5.1.1. usporedno su prikazani rezultati istraživanja provedenog na istih 12 postaja 2005. i 2015. godine. Vrijednosti RPLI za većinu postaja značajno su veće u 2005. godini osim na lokacijama lučice H1 ($U=165$, $p=0,344$) i referentne postaje P_1 ($U=143$, $p=0,123$, Slika 5.1.1.a) gdje su veće, ali ne statistički značajno. Suprotno od toga vrijednosti VDSI u 2015. godini veće su na postajama M1, M3, H1, P1 i P2, nego one u 2005. godini iako su vrijednosti statistički značajno veće samo na lokacijama nautičke marine M3 i referentne lokacije P2 (M3: $U=118$, $p=0,027$; P2: $U=92$, $p=0,003$; Slika 5.1.1.b). Smanjenje vrijednosti VDSI od 2005. do 2015. godine zabilježeno je na postajama B2, H3 i P3, no statistički značajno samo na lokaciji lučice H3 ($U=123$, $p=0,037$). Usporedba udjela sterilnih ženki pokazala je da je u 2015. godini njihov udio puno veći u svim nautičkim marinama (M1, M2 i M3), kao i u lučici H1 (Slika 5.1.1.c). U uvali koja se sezonski koristi B2 i referentnim postajama P1 i P2 u

2015. godini su zabilježene sterilne ženke premda na istim postajama u 2005. godini nije bilo sterilnih ženki.



Slika 5.1.1. Usporedba indeksa imposeksa volaka *Hexaplex trunculus* među lokacijama kategoriziranim prema brodskoj aktivnosti (M - nautičke marine, H - lučice, B - uvale koje se sezonski koriste, P – referentne lokacije) u 2005. i 2015. godini prema: (a) indeksu relativne duljine penisa (RPLI), (b) indeksu vas deferensa (VDSI) i (c) postotku sterilnih ženki. Zvjezdica označava statistički značajne razlike među godinama ($p<0,05$).

Indeks RPLI bio je značajno niži 2015. godine za većinu postaja, dok je VDSI bio viši za većinu postaja, pri čemu značajno viši samo za postaje Biograd (M3) i Drage (P2). Najmanje promjene u indeksu VDSI zabilježene su u uvalama koje se sezonski koriste (B). Dakle, prema indeksu RPLI zabilježen je padajući trend između 2005. i 2015. godine kod svih postaja, a prema indeksu VDSI intenzitet imposeksa je ostao isti ili se čak povećao u desetogodišnjem razdoblju. Zbog prethodno navedenog postavlja se pitanje koji od korištena dva indeksa je pouzdaniji za procjenu ekološkog stanja priobalnih voda s obzirom na onečišćenje TBT-om, osobito imajući u vidu da oba koreliraju s masenim udjelom TBT-a u tkivu vrste *H. trunculus*. Stroben i suradnici (1992) smatraju da je VDSI pozdaniji indikator imposeksa za vrstu *Tritia reticulata* zbog sezonskih promjena duljine penisa. Za razliku od njih Pelizzato i suradnici (2004) za usporedbu onečišćenih postaja radije koriste indeks relativne veličine penisa (RPSI) što opravdavaju većim rasponom varijacije indeksa povezanog s duljinom penisa od indeksa VDSI. S obzirom da su istraživanja u 2005. i 2015. godini provedena u istom dijelu godine (svibanj-srpanj), može se zaključiti da su indeksi RPLI i RPSI pogodni za korištenje, posebno zato što su oba indeksa za sve postaje bila manja od 100%. Svakako ne treba zanemariti činjenicu da je prema OSPAR programu praćenja stanja okoliša, Direktivi o vodama i mnogim studijama, ključni parametar imposeksa za procjenu onečišćenja TBT-om ipak VDSI i to zbog svog biološkog značaja budući da pruža informaciju o reproduktivnom kapacitetu populacije (OSPAR, 2004; WFD-UKTAG, 2014; Oehlmann i sur., 1998b; Laranjeiro i sur., 2015).

Zaključku o nesmanjenom intenzitetu imposeksa u desetogodišnjem razdoblju, koji se temelji na indeksu VDSI, dodatno pogoduje činjenica o povećanju udjela sterilnih ženki (stadij VDS 5) u 2015. godini kod većine istraživanih populacija (7 od 12 populacija) u odnosu na rezultate istraživanja provedenog 2005. godine. Imajući u vidu da indeks VDSI pruža informaciju o reproduktivnom kapacitetu populacije i riziku od njenog izumiranja, može se bez dvojbe zaključiti da zabrana korištenja TBT-a u protuobraštajnim bojama u Hrvatskoj nije rezultirala oporavkom istraživanih populacija vrste *H. trunculus*. Ipak, ovdje treba spomenuti istraživanje koje su proveli Abidli i suradnici (2009) na vrsti *H. trunculus* o razvoju imposeksa pri izloženosti različitim masenim koncentracijama TBT-a (5 i 50 ng/l). Njihovo istraživanje je pokazalo da je penis kod ženki volka koje su bile šest mjeseci izložene većim masenim koncentracijama TBT-a bio značajno dulji, dok je indeks VDSI bio isti za obje koncentracije izloženosti TBT-om. Prema tom istraživanju duljina penisa kod volka *H. trunculus* daje bolju informaciju o razini onečišćenja okoliša TBT-om budući da se najviši VDS stadij postiže već pri nižim masenim koncentracijama TBT-a. Na temelju svega prethodno navedenog različitost dobivenih rezultata s obzirom na različite indekse imposeksa korištene u ovom istraživanju može se protumačiti na sljedeći način: pad indeksa RPLI od 2005. do 2015. godine sugerira da je došlo do smanjenja onečišćenja morskog

okoliša TBT-om u desetogodišnjem razdoblju, dok indeks VDSI ukazuje na činjenicu da to smanjenje onečišćenja nije toliko da bi dovelo do oporavka istraživanih populacija volka *H. trunculus*.

Kako bi se utvrdila razina onečišćenja TBT-om, u sklopu istraživanja provedenog na području srednjeg Jadrana osim imposeksa izmjeren je i maseni udio butilkositrovih spojeva (TBT, DBT, MBT) u tkivu volka *H. trunculus* (2014. i 2015. godine) i u površinskom sedimentu (2015. godine), pri čemu je odvojeno razmatrano tkivo visceralne zavojnice i ostatak mekog tkiva volka. Ukupni BuT maseni udio (∑BuT=TBT+DBT+MBT) u tkivu volka kretao se od 0 do 348,3 ng Sn g^{-1} s.t. (istraživanje 2015. godine: postaja Biograd M3) odnosno do 452,0 ng Sn g^{-1} s.t. (istraživanje 2014. godine: postaja Split A1). Najviši maseni udjeli organokositrovih spojeva u istraživanju provedenom 2015. godine izmjereni su u marinama, nešto manji u lučicama, a najniži u uvalama koje se sezonski koriste i na referentnim postajama. U istraživanju provedenom 2014. godine maseni udjeli ∑BuT u tkivu volka na postajama koje su kategorizirane kao onečišćene bili su uglavnom veći od onih na referentnim postajama. Iako razlike u masenim udjelima ∑BuT među različitim parovima kategorija postaja nisu uvijek bili statistički značajni, ovim istraživanjem je potvrđeno da je razina brodske aktivnosti povezana s masenim udjelom butilkositrovih spojeva bioakumuliranih u tkivu volka, kao i s pokazateljima imposeksa. Pritom treba naglasiti da imposeks predstavlja ireverzibilno stanje koje je uzrokovano TBT-om bioakumuliranim kroz cijeli život jedinke (Axiak i sur., 2003; Laranjeiro i sur., 2015) i u tom smislu dijelom može predstavljati posljedicu davnije izloženosti TBT-u. Budući da se kao poluvijek TBT-a bioakumuliranog u mekušcima često navodi razdoblje od nekoliko mjeseci (Gomez-Ariza i sur., 1999), maseni udjeli butilkositrovih spojeva izmjerenih u tkivu volka *H. trunculus* na području srednjeg Jadrana nedvojbeno ukazuju na nedavnu izloženost onečišćenju TBT-om, vjerojatno u razdoblju od nekoliko mjeseci prije provedenih istraživanja. Također, iako između bioakumulacije TBT-a i razvoja imposeksa vjerojatno postoji određeni vremenski razmak, istraživanjima je utvrđena statistički značajna korelacija između različitih indeksa imposeksa (RPLI, RPSI, VDSI) i biokoncentracije TBT-a odnosno ∑BuT (Tablica 4.1.3. i Tablica 4.2.3.). Povezanost intenziteta imposeksa u puževa s razinom masenog udjela bioakumuliranog TBT-a potvrđena je i u drugim istraživanjima (npr. Axiak i sur. 1995; Pellizatto i sur., 2004; Ho & Leung, 2014).

Indeksi imposeksa značajnije su korelirali s masenim udjelom TBT-a, kod obje vrste tkiva u istraživanju provedenom 2014. godine, kao i kod ostatka mekog tkiva u istraživanju iz 2015. godine, dok je maseni udio ∑BuT u tkivu visceralne zavojnice nešto značajnije korelirao s indeksima imposeksa u istraživanju iz 2015. godine. Može se reći da maseni udio ∑BuT pouzdanije odražava ukupni unos TBT-a budući da se TBT u organizmu metaboličkim procesima

u kojima sudjeluje citokrom P-450 razgrađuje na DBT i MBT. Ako je TBT u organizam dospio putem ingestije, u početku se akumulira u tkivu visceralne zavojnice gdje dolazi do djelomične razgradnje na DBT i MBT nakon čega se sva tri spoja šire po drugim organima (Axiak i sur., 1995; Pellizzato i sur., 2004). U ovom istraživanju potvrđene su statistički značajne korelacije između TBT-a, DBT-a i MBT-a u tkivu visceralne zavojnice i u ostatku mekog tkiva, osim korelacije između TBT-a i MBT-a u ostatku mekog tkiva u istraživanju iz 2014. godine. Također statistički značajno su korelirali isti organokositrovi spojevi u različitim tkivima (visceralna zavojnica vc i ostatak mekog tkiva ot): TBT_{vz} vs TBT_{ot}; DBT_{vz} vs DBT_{ot} i MBT_{vz} vs MBT_{ot}. Na većini istraživanih postaja u srednjem Jadranu u ukupnom masenom udjelu organokositrovih spojeva, bez obzira na vrstu tkiva i spol volka, najveći je bio udio MBT-a, a najmanji TBT-a (MBT>DBT>TBT; Slika 4.1.15, Slika 4.1.16, Slika 4.2.11.) što pokazuje da se TBT brže metabolizira u DBT i MBT, nego li se bioakumulira iz okoliša. Do sličnih zaključaka u svom istraživanju došli su i Ide i suradnici (1997). Iako u istraživanju provedenom 2015. godine maseni udjeli butilkositrovih spojeva u različitim tkivima mužjaka i ženki većinom nisu bili značajno različiti, u istraživanju iz 2014. godine maseni udjeli TBT-a i DBT-a bili su značajno manji u tkivu visceralne zavojnice. I u mnogim drugim istraživanja zabilježene su različite raspodjele organokositrovih spojeva u različitim tkivima vrste *H. trunculus*. Neki autori utvrdili su značajno više masene udjele u tkivu visceralne zavojnice (Axiak i sur., 1995, 2003; Pellizzato i sur., 2004; Garaventa i sur., 2006a), a neki u ostatku mekog tkiva (Garaventa i sur., 2007).

S obzirom da istraživanje provedeno 2005. godine (Prime i sur., 2006) nije obuhvaćalo i analize masenih udjela organokositrovih spojeva u tkivu volka *H. trunculus*, nije bilo moguće odrediti trend promjene bioakumuliranog TBT-a. Predmetno istraživanje predstavlja prvo istraživanje takve vrste na području hrvatskog dijela srednjeg Jadrana. Usporedba masenog udjela ∑BuT u tkivu vrste *H. trunculus* u srednjem Jadranu s istraživanjem provedenim na području sjevernog Jadrana u razdoblju 2002-2003. godine, kad se izmjereni maseni udio ∑BuT kretao između 192 i 4233 ng Sn g^{-1} s.t. (Garaventa i sur., 2007), pokazuje da su maseni udjeli u srednjem Jadranu u 2015. godini bili 2 do 3 puta niži. Usporedbe s istraživanjima provedenim u razdoblju od 1992. do 2003. godine u drugim dijelovima Sredozemlja (Axiak i sur., 1995; Pelizzato i sur., 2004) također pokazuju da su maseni udjeli izmjereni u srednjem Jadranu u 2015. godini niži što ukazuje na smanjenje masenog udjela ∑BuT u volka.

Očekivane razlike između različitih kategorija postaja s obzirom na intenzitet brodske aktivnosti u srednjem Jadranu potvrđene su i rezultatima mjerenja masenog udjela butilkositrovih spojeva u sedimentu u sklopu istraživanja iz 2015. godine. Sediment iz nautičkih marina i lučica imao je slične masene udjele ∑BuT, srednji maseni udio u marinama iznosio je 104,2 ng Sn g^{-1}

s.t., a u lučicama 135,5 ng Sn g^{-1} s.t. U sedimentu s postaja gdje su niske brodske aktivnosti (uvale koje se sezonski koriste i referentne postaje) nije izmjerena prisutnost butilkositrovih spojeva, odnosno maseni udjeli su bili ispod granice detekcije. Maseni udio TBT-a bioakumuliranog u tkivu vrste *H. trunculus* na ovim postajama također je bio vrlo nizak, od 0,9 do 3,3 ng Sn g^{-1} s.t., što potvrđuje niske razine butilkositrovih spojeva u morskom okolišu s niskim intenzitetom brodskog prometa. Treba napomenuti da je sediment uzorkovan u lučici Baška Voda H1 bio šljunkovit čime se može objasniti izmjerena niska razina butilkositrovih spojeva na ovoj postaji budući da ovakav tip sedimenta ima vrlo nisku sposobnost adsorpcije TBT-a (Furdek i sur., 2016).

Iako je vrsta *H. trunculus* u stalnom kontaktu sa sedimentom, u ovom istraživanju nisu utvrđene statistički značajne korelacije između masenog udjela butilkositrovih spojeva u sedimentu s onima u tkivu volka, odnosno s indeksima imposeksa. Razlog tome može biti u karakteristikama sedimenta s obzirom na mogućnost adsorpcije TBT-a. Uzorci s postaja Milna M2, Baška Voda H1, Zaton B1, Lastovo B2, Crvena Luka B3, Brsečine P1 i Drage P2 bili su uglavnom pjeskoviti i šljunkoviti, a takvi sedimenti najčešće imaju nizak udio organske tvari i radi toga nisku sposobnost adsorpcije TBT-a. Suprotno tome, sedimenti koji sadrže više sitnijih čestica imaju veću sposobnost adsorpcije organske tvari i TBT-a što rezultira znatno sporijom razgradnjom TBT-a kod ovakvih sedimenata i čini ih dugoročnim izvorom onečišćenja TBT-om (Furdek i sur., 2016). Zbog resuspenzije onečišćenog površinskog sedimenta može doći do desorpcije TBT-a natrag u vodeni stupac čime se opet mogu ugroziti morski organizmi (Kim i sur., 2014; Pougnet i sur., 2014; Langston i sur., 2015; Suzdalev i sur., 2015). Nedavno istraživanje provedeno duž jadranske obale u razdoblju od 2009. do 2013. godine (Furdek, 2015) pokazalo je da su srednji maseni udjeli ∑BuT na postajama kategoriziranim kao nautičke marine i luke bili 302,3 i 296,2 ng Sn g^{-1}, a na postajama kategoriziranim kao lučice i referentne postaje bili 63,1 i 53,1 ng Sn g^{-1}. Zbog nedostatka replika u predmetnom istraživanju i činjenici da ovo istraživanje nije provedeno na istim postajama kao istraživanje Furdek i sur. (2015), nije bilo moguće statistički usporediti rezultate ova dva istraživanja, no ipak je zabilježeno smanjenje masenih udjela ∑BuT u nautičkim marinama i lukama, te lučicama i referentnim postajama. Budući da se brzina sedimentacije kreće od 0,5 do 1,0 cm godišnje, vrlo je teško odrediti trendove promjena u površinskom sedimentu (0-5 cm) u razdoblju kraćem od pet godina.

Istraživačke postaje iz 2014. godine kategorizirane su prema intenzitetu brodskog prometa neposredno prije početka istraživanja, dok su za istraživanje iz 2015. godine preuzete kategorije dodijeljene postajama još 2005. godine (Prime i sur., 2006). Primjetno je da se postaja u uzgajalištu školjkaša u Marini (N2) prema indeksu VDSI značajno ne razlikuje od onečišćenih postaja istraživanih 2014. godine, iako je prije početka istraživanja razvrstana u referentne postaje. Slično

je i s postajama Crvena Luka (B3) i Lastovo (B2) koje su prije istraživanja provedenog 2005. godine svrstane u uvale koje se sezonski koriste, ali se prema indeksu VDSI iz 2015. godine ne razlikuju od postaje u Malom Stonu (P3), za razliku od druge dvije referentne postaje Brsečine (P1) i Drage (P2). Postaja Zaton (B1) prema indeksu VDSI sličnija je ovim dvjema postajama od postaje P3. Očito je da je u proteklih 10 godina došlo do promjena u intenzitetu brodskog prometa na pojedinim istraživačkim postajama, pa bi se određeni manji broj postaja u istraživanju provedenom u 2015. godini svrstalo u drugačije kategorije intenziteta brodskog prometa u odnosu na one u koje su bile svrstane u istraživanju u 2005. godini.

Na osnovi izmjerenih masenih udjela ∑BuT, u tkivima volka *H. trunculus* i sedimentu, može se zaključiti da je onečišćenje TBT-om u posljednjih 10 godina u Hrvatskoj smanjeno kao posljedica zabrane korištenja TBT-a u protuobraštajnim premazima. Međutim, smanjenje unosa TBT-a u morski okoliš nije rezultiralo smanjenjem imposeksa kod vrste *H. trunculus* i oporavkom njenih populacija jer su maseni udjeli TBT-a u okolišu još uvijek viši od onih koji uzrokuju visoke stadije imposeksa kod lokalnih populacija volka. Od svih dosad istraživanih vrsta puževa, vrsta *H. trunculus* smatra se najosjetljivijom vrstom u smislu njenog biološkog odgovora na TBT (Axiak i sur., 1995; Abidli i sur., 2009). Prethodno navedeno dodatno je potvrđeno i ovim istraživanjem budući da je najviši VDS stadij 5 bio razvijen već kod masenog udjela TBT-a nižeg od 5 Sn g^{-1} s.t., odnosno masenog udjela ∑BuT manjeg od 50 ng Sn g^{-1} s.t. Ove vrijednosti značajno su niže od onih koje su zabilježili Pelizzato i suradnici (2004) i Garaventa i suradnici (2007), a koje su iznosile 90 Sn g^{-1} s.t. odnosno 235 Sn g^{-1} s.t. Prethodno navedeno u skladu je sa zaključkom Garavente i suradnika (2007) o potencijalnoj nepouzdanosti analiza korelacije VDSI i masenom udjelu organokositrovih spojeva u tkivu kad je riječ o visokim masenim udjelima jer su kod istraživanih populacija vrijednosti bioakumuliranih butilkositrovih spojeva često iznad granice saturacije. Prisutnost organokositrovih spojeva u moru nakon uvođenja zabrane korištenja TBT-a potvrđena je i istraživanjem provedenim na tkivu dagnji *Mytilus galloprovincialis* uz hrvatsku obalu u razdoblju 2009-2010. godine (Furdek i sur., 2012).

5.2. Korištenje vrste *Hexaplex trunculus* kao bioindikatora onečišćenja TBT-om u sklopu ocjene ekološkog stanja priobalnih voda prema Direktivi o vodama

Direktiva o vodama (WFD, Aneks V, 2000/60/EZ) zahtijeva klasifikaciju priobalnih voda kroz ocjenu ekološkog i kemijskog stanja priobalnih voda. Elementi kakvoće koji moraju biti korišteni za procjenu ekološkog stanja sadrže i biološke elemente kakvoće među kojima se nalazi i sastav i bogatstvo faune bentoskih beskralježnjaka. Iako se posebno ne navodi u Direktivi, ocjena

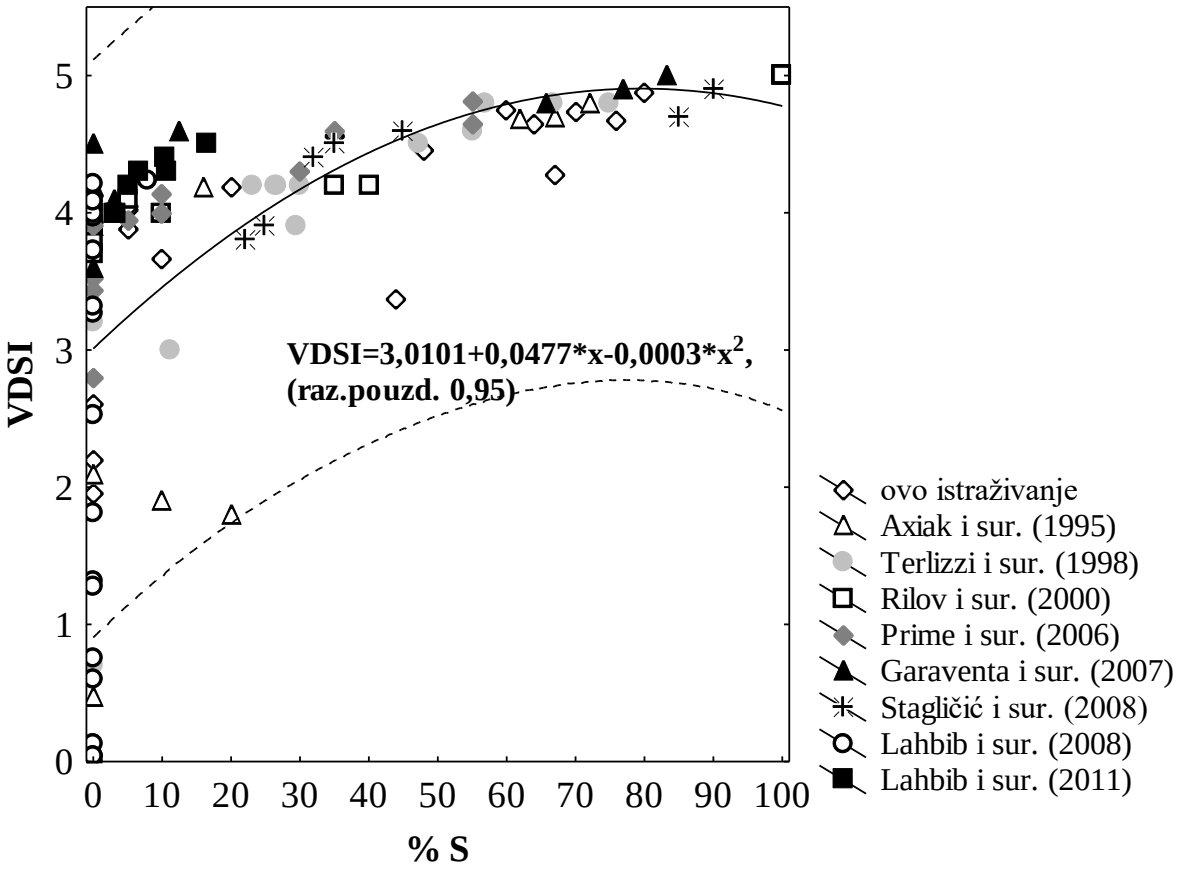
imposeksa mogla bi se koristiti kao jedan od pokazatelja u sklopu biološkog elementa kakvoće sastava i bogatstva faune bentoskih beskralježnjaka budući da predstavlja specifičan učinak jednog ksenobiotika na osjetljivu bioindikatorsku vrstu (WFD-UKTAG, 2014). Za ocjenu ekološkog stanja sukladno Direktivi treba ocijeniti svaki od elemenata biološke kakvoće korištenjem omjera ekološke kakvoće (OEK) kao odnosa između vrijednosti biološkog parametra u određenom vodnom tijelu i vrijednosti za taj parametar u referentnim uvjetima primjenjivim za to vodno tijelo. Ocjena ekološkog stanja temelji se na vrijednostima OEK koje definiraju pet klasa ekološkog stanja: vrlo dobro ili referentno, dobro, umjereno dobro, loše i vrlo loše. Detaljan opis svake od klasa ekološkog stanja, na osnovi podataka iz OSPAR (2004) i Direktive o vodama (Aneks V, 2000/60/EC), dali su Laranjeiro i suradnici (2015). Kod primjene imposeksa kao elementa biološke kakvoće, vrijednost OEK trebalo bi računati korištenjem VDSI kako je prikazano u izrazu 1 (WFD-UKTAG, 2014; Laranjeiro i sur. 2015):

$$OEK = \frac{(M-O)}{M} \qquad (1)$$

(M = maksimalna vrijednost VDSI koju populacija može postići, O = izmjereni VDSI).

Imposeks kod vrste *Nucella lapillus* već je predložen kao alat za ocjenu ekološkog stanja u priobalnim vodama Velike Britanije (WFD-UKTAG, 2014). Laranjeiro i suradnici (2015) predložili su klase ekološkog stanja za vrste *N. lapillus*, *Tritia reticulata* i *Littorina littorea*. S obzirom da različite vrste puževa imaju različitu osjetljivost na TBT i različit razvoj imposeksa (Axiak i sur., 1995), predložene klase ekološkog stanja odnosno granične vrijednosti OEK za spomenute vrste nisu primjenjive izravno na vrstu *Hexaplex trunculus*. Štoviše, niti jedna od tih vrsta nije široko rasprostranjena u Sredozemlju i stoga se ne može koristiti u monitoring programima unutar Sredozemlja prema Direktivi o vodama. Za razliku od njih, vrsta *H. trunculus* raširena je u Sredozemlju, vrlo je osjetljiva na onečišćenje TBT-om te reagira imposeksom već pri vrlo niskim masenim koncentracijama TBT-a, što ju potencijalno čini primjerenim bioindikatorom u monitoring programima na području Sredozemlja prema Direktivi o vodama. Da bi se volak *H. trunculus* mogao koristiti kao bioindikator ekološkog stanja priobalnih voda, potrebno je definirati granične vrijednosti OEK za različite klase ekološkog stanja. Jedan od ciljeva ovog istraživanja upravo je definiranje tih graničnih vrijednosti na temelju dostupnih podataka o imposeksu (VDSI i postotak sterilnih ženki % S) kod volka *H. trunculus* iz dosadašnjih istraživanja (ovo istraživanje; Axiak i sur., 1995; Terlizzi i sur., 1998; Rilov i sur., 2000; Prime i sur., 2006; Garaventa i sur., 2007; Stagličić i sur., 2008; Lahbib i sur., 2011) kako je opisano u Laranjeiro i suradnici (2015). Uzimajući u obzir da je osnovna svrha Direktive o vodama očuvanje raznolikosti i bogatstva svake populacije, pojava sterilnosti u ženki može biti jedan od čimbenika u određivanju granica različitih klasa ekološkog stanja vezano uz imposeks. Također, vrlo je važno napomenuti da endokrini

modulatori mogu imati opsežne posljedice za adaptivnu vrijednost genotipa (fitnes) populacije, što prelazi okvire same pojave sterilnosti ženki kod manjeg skupa jedinki. Ranija istraživanja pokazala su da TBT koji je prisutan u okolišu utječe na značajke vezane uz Darwinov fitnes populacija vrste *H. trunculus*, kao što su rast, mortalitet i plodnost (Abidli i sur., 2009; Lahbib i sur., 2012). Daljnja istraživanja trebala bi za cilj imati otkrivanje egzaktnog utjecaja na fitnes populacije pri koncentracijama nižim od onih koje uzrokuju sterilnost kod ženki. Na slici 5.2.1. prikazan je odnos između postotka sterilnih ženki i odgovarajuće vrijednosti VDSI na temelju devet istraživanja provedenih na 112 populacija: ovo istraživanje – 19 populacija; Rilov i sur. (2000) - 16 populacija; Prime i sur. (2006) - 12 populacija; Garaventa i sur. (2007) - 8 populacija; Stagličić i sur. (2008) - 7 populacija; Lahbib i sur. (2008) – 20 populacija; Lahbib i sur. (2011) – 6 populacija.



Slika 5.2.1. Odnos između udjela sterilnih ženki (%S) i indeksa VDSI određen na 112 populacija vrste *Hexaplex trunculus* iz područja Sredozemlja: polinominalna funkcija VDSI= 3,0101+0,0477*x-0,0003*x^2 s razinom pouzdanosti (raz. pouzd.) p=0,95.

Vrlo dobro ili referentno stanje odgovara nepromijenjenim okolišnim uvjetima i postiže se pri odsutnosti (ili vrlo maloj prisutnosti) antropogenih utjecaja. Radi se o stanju koje odgovara vrlo niskim masenim koncentracijama TBT-a u moru koje su najčešće ispod granica detekcije

najosjetljivijih analitičkih metoda. Zbog nedostatka okolišnih podataka vezanih uz stadije imposeksa kod volka *H. trunculus* (VDSI<1), vrlo je teško utvrditi vrijednosti OEK i pripadajući VDSI za ovu klasu. Laranjeiro i suradnici (2015) su za ovu klasu usvojili vrijednost VDSI (VDSI<0,3) koja je za *N. lapillus* i *T. reticulata* postavljena od strane OSPAR (2004). Dobro stanje definirano je odsustvom rizika za izumiranje populacije, što kad je u pitanju imposeks podrazumijeva barem odsustvo sterilnih ženki. Prema podatcima za vrstu *H. trunculus* s područja Sredozemlja predstavljenim na slici 5.2.1. sterilne ženke se javljaju u populacijama s indeksom VDSI>3,0 (razina pouzdanosti p=0,95). Ipak vidljivo je da su sterilne ženke zabilježene i u nekoliko populacija s vrijednostima 1,8<VDSI<3,0 i radi toga bi klasa dobrog stanja, koja predstavlja populacije bez sterilnih ženki, trebala biti određena granicom VDSI<1,8. Umjereno dobro stanje podrazumijeva nizak rizik od izumiranja populacije i uključuje pojavu sterilnih ženki, dok loše stanje odgovara ozbiljnim devijacijama u bogatstvu populacije uzrokovanim visokim sterilitetom ženki. Prema Laranjeiro i suradnicima (2015), granična vrijednost VDSI između umjereno dobrog i lošeg stanja povezana je s razlikom između niskog i visokog rizika od izumiranja populacije te odgovara udjelu sterilnih ženki većem od 50%. Odnos između vrijednosti indeksa VDSI i 50%-tnog udjela sterilnih ženki prikazan na slici 5.2.1. odgovara približno vrijednosti VDSI 4,6 pa bi ona trebala biti predložena kao granična vrijednost između umjereno dobrog i lošeg stanja. Vrlo loše stanje odnosi se na izumiranje populacije i odsustvo jedinki koje bi se mogle uzorkovati zbog snažnog onečišćenja TBT-om.

Vrijednosti VDSI koje su predložene kao granične vrijednosti između pojedinih klasa pretvorene su u OEK vrijednosti klasa ekoloških stanja prema izrazu 1 (Tablica 5.2.1.). Za usporedbu u tablici 5.2.1. prikazane su granične vrijednosti OEK za vrste *N. lapillus* i *T. reticulata* (Laranjeiro i sur., 2015) koje se najčešće koriste u monitorinzima uz europsku atlantsku obalu. Predložene granične vrijednosti predstavljaju tek prvi korak u uspostavljanju OEK klasa za imposeks kod vrste *H. trunculus* i trebale bi se opravdati i potvrditi na temelju puno većeg skupa podataka. Dodatna istraživanja potrebna su posebno kod vrlo niskih koncentracija TBT-a kad je VDSI≤1.

Tablica 5.2.1. Predložene vrijednosti OEK definirane za korištenje imposeksa kao elementa biološke kakvoće za ocjenu klase ekološkog stanja u okviru Direktive o vodama

Klasa ekološkog stanja	*Nucella lapillus* (Laranjeiro i sur., 2015)		*Tritia reticulata* (Laranjeiro i sur., 2015)		*Hexaplex trunculus* (ovo istraživanje)	
	Predložena OEK klasa	Odgovarajući VDSI	Predložena OEK klasa	Odgovarajući VDSI	Predložena OEK klasa	Odgovarajući VDSI
Vrlo dobro	1,00-0,95	0,0-0,3	1,00-0,93	0,0-0,28	np	np
Dobro	0,95-0,50	0,3-3,0	0,93-0,80	0,28-0,8	0,64	<1,8
Umjereno dobro	0,50-0,25	3,0-4,5	0,80-0,40	0,8-2,4	0,64-0,08	1,8-4,6
Loše	0,25-0,00	4,5-6,0	0,40-0,00	2,4-4,0	0,08-0,00	4,6-5,0
Vrlo loše	odsustvo populacije				odsustvo populacije	

np – nije primjenjivo u ovom istraživanju

Na osnovi gore predloženih OEK klasa za vrstu *H. trunculus* ocijenjeno je ekološko stanje morskog okoliša na području srednjeg Jadrana za 2015. godinu s obzirom na stanje populacije volaka. Pritom treba naglasiti, kako je i ranije spomenuto, da se ne radi o ukupnoj ocjeni ekološkog stanja, već samo o ocjeni po jednom od elemenata biološke kakvoće. Rezultati provedenog istraživanja pokazuju da na niti jednoj od istraživanih lokacija po biološkom elementu kakvoće koji se temelji na imposeksu nije postignuto stanje klasificirano kao dobro pa čak ni u području Malostonskog zaljeva koji predstavlja zaštićeni dio prirode. Sve istraživane nautičke marine (Marina M1, Milna M2, Biograd M3) i lučica Baška Voda H1 ocijenjeni su kao područja lošeg ekološkog stanja u 2015. godini, a preostale lučice, uvale koje se sezonski koriste i referentne postaje ocijenjeni su kao područja umjereno dobrog ekološkog stanja. Slično je i za lokacije istraživane 2014. godine. Rezultati predstavljeni u ovom radu pokazali su da do 2015. godine nije postignuto dobro ekološko stanje priobalnih voda koje je cilj Direktive o vodama. Kad se ista klasifikacija ekološkog stanja primjeni na rezultate istraživanja iz 2005. godine, može se zaključiti da zakonska zabrana korištenja TBT-a u protuobraštajnim premazima nije dovela do oporavka morskog okoliša u proteklih 10 godina i da je za to potrebno znatno duže razdoblje (ili neke druge remedijacijske mjere).

5.3. Povezanost biomarkera oksidativnog stresa u tkivu volka *Hexaplex trunculus* s imposeksom

Dosadašnja istraživanja aktivnosti biomarkera oksidativnog stresa provedena na vrsti *Hexaplex trunculus* uglavnom su vezana uz istraživanja izloženosti teškim metalima i toksičnosti kao posljedici te izloženosti. Potvrđena je korelacija aktivnosti enzima acetilkolinesteraze, katalaze i glutation S-tranferaze s izloženosti volka onečišćenju kadmijem, bakrom, karbofuranom

i lindanom (Roméo i sur., 2006), te aktivnosti katalaze s izloženosti onečišćenju kadmijem i insekticidom permetrinom (Mahmoud i sur., 2012). U istraživanju provedenom na volku tijekom 2014. godine uz istočnu jadransku obalu zabilježena je slaba negativna korelacija masenog udjela TBT-a samo sa sadržajem malondialdehida i to u ostatku tkiva volka. Korelacija istog ranga potvrđena je i između sadržaja malondialdehida i stadija imposeksa. Slično su, ali za Petrovo uho *Haliotidae* Rafinesque, 1815, potvrdili Jia i suradnici (2009), kod kojeg su pri izloženosti TBT-u zabilježili povećanje koncentracije malondialdehida. Iako su u istraživanju provedenom na jadranskim volcima vrijednosti aktivnosti katalaze (2,17 - 221,91 μmol $min^{-1}mg^{-1}$ proteina) veće od vrijednosti aktivnosti katalaze koje su Mahmoud i suradnici (2012) zabilježili kod volaka izloženih kadmiju (0 – 90 μmol $min^{-1}mg^{-1}$ proteina), TBT najvjerojatnije tome nije bio uzrok budući da nije potvrđena povezanost s onečišćenjem istraživanih postaja.

Aktivnosti pojedinih enzima staničnog stresa u tkivu volaka bila je promjenjiva među različito onečišćenim postajama, ali i unutar pojedinih postaja. Slično je u Jadranu zabilježeno i za vrstu *Mytilus galloprovincialis* (npr. Štambuk i sur., 2013; Sabolić, 2016). Statistički značajna razlika između populacija volaka s onečišćenih i referentnih postaja utvrđena je za aktivnost enzima glutation reduktaze i glutation S-transferaze pri čemu je veća aktivnost enzima zabilježena kod onečišćenih postaja. Ipak, dobivene rezultate treba sagledavati u širem kontekstu ne ograničavajući se isključivo kriterijem onečišćenosti postaje. Ponekad se slična razina aktivnosti pojedinih enzima staničnog stresa bilježi i na onečišćenim i na referentnim postajama (Štambuk i sur., 2013; Sabolić, 2016). Sabolić (2016) ovu pojavu pojašnjava inhibicijom aktivnosti pojedinih enzima poput katalaze, glutation reduktaze i glutation S-transferaze, koja započinje nakon dosezanja maksimuma enzimske aktivnosti, pozivajući se na brojna ranija istraživanja (npr. Winston & Di Giulio, 1991; Regoli & Principato, 1995; Dagnino i sur., 2007; Banni i sur., 2010). Naime, aktivnost ovih enzima raste sa staničnim stresom koji se javlja zbog onečišćenja, no kad aktivnost dosegne svoj maksimum dolazi do inhibicije enzima jer sinteza proteina počinje nadvladavati katalizu. Radi toga na pojedinim onečišćenim postajama aktivnost enzima prestaje biti mjerodavna za opisivanje stresa. Primjer prethodno navedenog je aktivnost katalaze kod volka koja se pokazala najmanja na onečišćenoj postaji Split trajektna luka (A1), a najveća na referentnoj postaji Mali Ston (N1), iako je katalaza potvrđena kao biomarker izloženosti onečišćivačima poput nekih teških metala i pesticida (npr. Khessiba i sur., 2001; Richardson i sur., 2008; Mahmoud i sur., 2012). Ovakav rezultat može se protumačiti kao jače (ili duže) onečišćenje postaje A1, te slabije (ili kraće), ali prisutno, onečišćenje postaje N1. Uzroke statistički značajne razlike u aktivnosti glutation reduktaze i glutation S-transferaze između onečišćenih i referentnih postaja bi, osim u izloženosti drugim ksenobioticima, trebalo istražiti i u drugim čimbenicima koji imaju

utjecaja na aktivnost biomarkera oksidativnog stresa poput temperature i saliniteta, dostupnosti hrane i načinu života (Sheehan & Power, 1999; Petrović i sur., 2004). Svakako, da bi se aktivnost enzima staničnog stresa mogla povezati s izloženosti volka TBT-u, potrebno je provesti istraživanje u kontroliranim uvjetima radi sveobuhvatnog uvida u učinke TBT-a na oksidativni stres (Bhagat i sur., 2016).

5.4. Povezanost sadržaja stabilnih izotopa ugljika i dušika u tkivu volka *Hexaplex trunculus* s kategorijom onečišćenosti staništa TBT-om

Istraživanjem stabilnih izotopa provedenom 2015. godine na volcima *Hexaplex trunculus* nije utvrđena povezanost sadržaja izotopa s kategorijama brodskog prometa istraživanih postaja. Dosadašnjim istraživanjima različitih morskih hranidbenih lanaca koja su uključivala vrstu *H. trunculus* putem sadržaja stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) potvrđeno je da se radi o bentoskoj gornjoj predatorskoj i strvinarskoj vrsti (Marín-Guirao i sur., 2008; Deudero i sur. 2011; Careddu i sur., 2015). Vrijednosti $\delta^{15}N_{air}$ izmjerene kod volaka u ovom istraživanju potvrđuju da se radi o vrsti koja pripada višoj trofičkoj razini u odnosu na do sada u Jadranu istraživane vrste školjkaša uključujući *Mytilus galloprovincialis, Ostrea edulis* Linnaeus, 1758, *Modiolus barbatus* (Linnaeus, 1758) i *Arca noae* Linnaeus, 1758 (Ezgeta Balić, 2013; Župan i sur., 2014). Usporedbom srednje vrijednosti sadržaja stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) u volcima sakupljenim uz jadransku obalu (9,89±0,91‰) s rezultatima drugih istraživanja na ovoj vrsti, vidljivo je da je $\delta^{15}N_{air}$ kod volaka uz jadransku obalu skoro isti kao onaj kod volaka sakupljenih u području Malorke (10,72±0,43, Deudero i sur. 2011), ali i dva puta veći od onog kod volaka sakupljenih u području lagune Mar Menor u jugoistočnom dijelu Španjolske 2004. godine (oko 5‰ i 7‰, Marín-Guirao i sur., 2008). Ako se pretpostavi da po jednoj trofičkoj razini dolazi do povećanja $\delta^{15}N_{air}$ od 3,4±1,1‰ (Minagawa & Wada, 1984), ovakav rezultat može upućivati na različite trofičke razine različitih populacija volaka u Sredozemlju. U istraživanju provedenom u Jadranu, $\delta^{15}N_{air}$ je varirao od 7,9‰ (Mali Ston P3) do 11,7‰ (Milna M2) što se, osim mogućom različitom strategijom prehrane između ove dvije populacije, može objasniti i mogućim povećanim antropogenim unosom dušika u okoliš, npr. ispuštanjem otpadnih voda koje su bogate dušikom u blizini istraživanih postaja (Fry i sur., 2003). Naime, u većem dijelu hrvatskog Jadrana još uvijek nisu izgrađeni uređaji za pročišćavanje otpadnih voda kojima se snižava udio dušika u otpadnim vodama. Povećan $\delta^{15}N_{air}$ u tkivu nekih drugih vrsta koje su obitavale u blizini ispusta otpadnih voda u Jadranu potvrdila su i druga istraživanja (Dolenec i sur., 2006, 2007, Dolenec i sur., 2011).

Sadržaj stabilnih izotopa ugljika ($\delta^{13}C_{VPDV}$) u tkivu volka značajno se razlikovao između različitih postaja, od -19,8‰ u Malom Stonu (P3) do -13,7‰ u Visu (H3), što ukazuje na različite izvore prehrane istraživanih populacija. Usporedba s rezultatima drugih istraživanja u Jadranu ukazuje da se volak *H. trunculus* nalazi na istoj trofičkoj razini kao i vrste školjkaša *A. noae* (-19,55±0,15‰, Ezgeta Balić, 2013; -19,11±0,82‰, Župan i sur., 2014) i *M. barbatus* (-19,91±0,24‰, Ezgeta Balić, 2013), iako je volak predator koji se hrani vrstom *A. noae* (Peharda & Morton, 2006; Župan i sur., 2014). Istraživanje $\delta^{13}C_{VPDV}$ ukazuje na donekle različite izvore prehrane jadranskih populacija volka i ranije istraživanih sredozemnih populacija (oko -13,7‰, Marín-Guirao i sur., 2008; -14,96±0,72‰, Deudero i sur. 2011).

U ovom istraživanju sadržaj stabilnih izotopa kod vrste *H. trunculus* analiziran je isključivo u mišićnom tkivu i nije moguće raspravljati o izotopskom razdvajanju po tkivima s obzirom na njihov biokemijski sastav i posljedično različitu raspodjelu energije koja se dobiva iz hrane. Promjene u okolišu također mogu imati utjecaja na različite sadržaje stabilnih izotopa u tkivu pa je za razumijevanje prijenosa energije potrebno provesti kontrolirane laboratorijske eksperimente (Ezgeta Balić, 2013).

5.5. Razlike u morfometrijskim obilježjima i gonadosomatskom i indeksu kondicije volka *Hexaplex trunculus* s obzirom na kategoriju onečišćenosti staništa TBT-om

U oba istraživanja, i 2014. i 2015. godine, ženke volka *Hexaplex trunculus* bile su značajno dulje od mužjaka. Ovakav rezultat u skladu je s istraživanjima koja su za ovu vrstu proveli Vasconcelos i suradnici (2008) i Mutlu (2013). Derbali i suradnici (2014) veći udio ženki među velikim jedinkama puževa pojašnjavaju mogućom većom potrošnjom energije ženki na rast nego na razmnožavanje. Postavlja se pitanje može li razlog takve raspodjele energije kod ženki biti razvijen imposeks. Naime, i u istraživanju iz 2014. godine i u onom iz 2015. godine utvrđena je korelacija između stadija imposeksa i duljine ženke, posebno izražena u istraživanju iz 2014. godine (2014. godina: $r=0,411$, $p<0,001$; 2015. godina: $r=0,175$, $p<0,01$), slično kao i kod nekih drugih vrsta, npr. vrste *Nucella lapillus* (Son i Hughes, 2000). Kad se odbaci parazitizam kao mogući uzrok većih dimenzija ženki s imposeksom, može se zaključiti da je veći somatski rast vjerojatno posljedica slabije reproduktivne sposobnosti uslijed uznapredovalog imposeksa (Terlizzi i sur., 1999; Son & Hughes, 2000; Rilov i sur., 2000). Osim s duljinom jedinki, indeks VDSI korelira i s masom volka odnosno masom kućice (istraživanja 2014. i 2015. godine), ali i svim ostalim mjerenim morfometrijskim obilježjima (istraživanje 2014. godine). Korelaciju stadija imposeksa sa širinom kućice potvrdila su i druga istraživanja (npr. Terlizzi i sur., 1999;

Lahbib i sur. 2009b). Također, mužjaci s jače onečišćenih postaja bili su statistički značajno dulji u odnosu na mužjake sa slabije onečišćenih postaja što može ukazivati i na postojanje utjecaja onečišćenosti TBT-om na rast mužjaka.

Specifična kombinacija odnosa različitih morfometrijskih značajki predstavlja oblik jedinke. Duljina kućice korelirala je sa širinom kućice kod ženki istraživanih 2015. godine, ali ne i 2014. godine. Ono što je koreliralo i kod mužjaka i kod ženki u oba istraživanja bila je širina otvora kućice u odnosu na širinu kućice te visinu otvora kućice. Također, u istraživanju iz 2015. godine, te kod mužjaka u istraživanju iz 2014. godine, uočena je korelacija duljine kućice s visinom otvora kućice. Slične rezultate zabilježili su i Lahbib i suradnici (2009b) koji su kod ženki s područja Tunisa utvrdili korelaciju duljine sa širinom kućice i širinom otvora kućice, ali puno snažniju nego u ovom istraživanju ($r \geq 0,8$, $p < 0,05$). Snažnu korelaciju između duljine volka i niza drugih morfometrijskih obilježja zabilježili su i Vasconcelos i suradnici (2016) kod volaka *s* područja Portugala ($r > 0,9$, $p < 0,001$). Ipak, u istraživanju koje je također provedeno na volcima, ali u Jadranskom moru, kao i u ovom istraživanju, zabilježena je varijabilnost u morfometrijskim obilježjima koja uvjetuju oblik volka, vjerojatno zbog specifičnosti okolišnih uvjeta (Cecalupo i sur., 2006; Vasconcelos i sur., 2016). Različitost u odnosu morfometrijskih značajki može biti posljedica osobina staništa (Son i Hughes, 2000), ali i fizioloških procesa u pojedinim razvojnim stadijima jedinke zbog čega bi kod tumačenja rezultata trebalo voditi računa o starosti odnosno veličini jedinke (Vasconcelos i sur., 2016). Lahbib i suradnici (2009b) različitost oblika volaka koje su uzorkovali na istoj lokaciji tumače kao moguću genetsku različitost ili prilagodbu uvjetovanu predatorima. Na području Sredozemlja i "gibraltarskog" Atlantika Marzouk i suradnici (2016) su na temelju morfometrijskih razlika definirali četiri vrste stoka volka *H. trunculus* od kojih je jedan istočno-mediteranski stok koji obitava na području Jadranskog i Egejskog mora te Tunisa. Razlike u morfometrijskim obilježjima stokova pojašnjavaju prilagodbom na različite okolišne i oceanografske uvjete u različitim dijelovima Sredozemlja odnosno Atlantiku. Son i Hughes (2000) ustanovili su pozitivnu korelaciju indeksa VDSI kod vrste *N. lapillus* s pjeskovitošću staništa te relativno slabu korelaciju s izloženosti valovima. Slično bi vjerojatno bilo i kod vrste *H. trunculus* budući da se u literaturi navodi da najčešće obitava u staništima koja nisu izložena valovima (Rilov i sur., 2004).

Kondicijski indeks CI 2 (masa ostatka mekog tkiva/duljina kućice) je značajno korelirao s indeksom CI 1 (ukupna masa mekog tkiva/duljina kućice). Naravno, i gonadosomatski indeks GSI (masa gonada i hepatopankreasa/duljina kućice) pokazao je isti trend. Kondicijski indeks CI 3 (masa kućice/duljina kućice) korelirao je s indeksom CI 1, osim kod ženki istraživanih 2014. godine. Vasconcelos i suradnici (2016) također su zabilježili snažne korelacije vrijednosti ukupne

mase volka s masom mekog tkiva i masom kućice. I kod mužjaka i kod ženki u istraživanju provedenom 2014. i/ili 2015. godine utvrđena je značajna razlika indeksa CI 1 i CI 2 među onečišćenim i referentnim postajama. Gonadosomatski indeks (GSI) je bio značajno veći kod oba spola na onečišćenim lokacijama što je djelomično u skladu s istraživanjem Lahbib i suradnika (2009b) koji su bilježili GSI kroz cijelu godinu na TBT-om različito onečišćenim lokacijama i utvrdili varijacije u odnosima GSI kroz godinu, ovisno ne samo o onečišćenosti lokacije, već i o spolnoj aktivnosti pa je za tumačenje rezultata potrebno imati predznanje o dinamici spolne aktivnosti vrste kroz godinu. Varijabilnost međusobnog odnosa kondicijskog i gonadosomatskog indeksa kroz godinu zabilježena je i kod drugih vrsta (npr. Burčul, 2015).

6. ZAKLJUČAK

Iz provedenog istraživanja došlo se do sljedećih zaključaka:

- Zabrana korištenja tributilkositra (TBT) u protuobraštajnih premazima koja je na snazi od 2006. godine u Republici Hrvatskoj rezultirala je smanjenjem razine TBT-a u hrvatskom dijelu srednjeg Jadrana što sugerira pad indeksa relativne duljine penisa (RPLI) od 2005. do 2015. kod istraživanih populacija volka *Hexaplex trunculus*.
- Zabrana korištenja TBT-a u protuobraštajnih premazima nije rezultirala oporavkom istraživanih populacija volka *H. trunculus* u desetogodišnjem razdoblju od 2005. do 2015. godine budući da je kod svih istraživanih populacija ove vrste utvrđena prisutnost imposeksa i to s vrlo visokim udjelom ženki s imposeksom, 88% i više. Kod većine istraživanih populacija (7 od 12) povećao se udio sterilnih ženki (stadij VDS 5) u ovom razdoblju.
- Ovo istraživanje predstavlja prvo istraživanje povezanosti masenog udjela butilkositrovih spojeva u tkivu volka i sedimentu s intenzitetom imposeksa u hrvatskom dijelu Jadrana. Istraživanjem je, sukladno rezultatima sličnih istraživanja u svijetu, potvrđena korelacija intenziteta imposeksa s masenim udjelom TBT-a i ∑BuT (∑BuT=TBT+DBT+MBT) u tkivima volka. Rezultati istraživanja masenog udjela butilkositrovih spojeva bioakumuliranih u različitim tkivima volka predstavljaju korisnu početnu bazu podataka za buduća istraživanja onečišćenja Jadrana TBT-om i učinkovitosti zabrane njegovog korištenja u protuobraštajnim premazima.
- Radom su predložene granične vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) u svrhu potencijalnog korištenja vrste *H. trunculus* kao bioindikatora u ocjeni ekološkog stanja priobalnih voda u okviru Direktive o vodama s aspekta onečišćenja voda TBT-om i posljedičnim razvojem imposeksa. Predloženo uspostavljanje OEK klasa za imposeks kod vrste *H. trunculus* dugoročno pruža nove mogućnosti u monitoring programima koji se provode u okviru Direktive o vodama u Sredozemlju.
- Rezultati provedenog istraživanja koji se odnose na intenzitet imposeksa kod pojedinih jadranskih populacija vrste *H. trunculus* pokazuju da zahtjev Direktive o vodama o postizanju dobrog ekološkog stanja priobalnih voda do 2015. godine nije postignut na području hrvatskog dijela srednjeg Jadrana.
- Rezultati dijela istraživanja vezanog uz aktivnost enzima staničnog stresa (katalaze CAT, glutation S-transferaze GST, glutation reduktaze GR, sadržaj malondialdehida MDA,

sadržaj karbonila, acetilkolinesteraze AChE) ukazuju na povećanu aktivnost glutation reduktaze i glutation S-transferaze kod volaka s postaja onečišćenih organokositrovim spojevima. Da bi se aktivnost enzima mogla povezati s izloženosti volka TBT-u, potrebno je provesti detaljno istraživanje u kontroliranim uvjetima radi sveobuhvatnog uvida u učinke TBT-a na oksidativni stres.

- Istraživanjem stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}N_{air}$) i ugljika ($\delta^{13}C_{VPDV}$) u tkivu volka *H. trunculus* nije utvrđena povezanost stabilnih izotopa sa stupnjem onečišćenosti istraživanih postaja TBT-om. Povećani sadržaj $\delta^{15}N_{air}$ na pojedinim postajama može se objasniti povećanim antropogenim unosom dušika u okoliš putem nepročišćenih otpadnih voda. Istraživanje $\delta^{13}C_{VPDV}$ ukazuje na donekle različite izvore prehrane jadranskih populacija volka.
- Potvrđeno je da su odrasle ženke volka veće od mužjaka, jednim dijelom i zbog visokih stadija imposeksa koji su razvile.

7. LITERATURA

Abidli, S., Y. Lahbib & N.T. El Menif. 2009. Effects of TBT on the imposex development, reproduction and mortality in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 89: 139-146.

Abidli, S., Y. Lahbib & N.T. El Menif. 2011. Imposex and butyltin concentrations in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) from the northern Tunisian coast. Environ. Monit. Assess., 177: 375-384.

Abidli, S., Y. Lahbib, P.R. Gonzalez, J.I.G. Alonso & N.T. El Menif. 2013. Imposex and butyltin burden in *Bolinus brandaris* (Mollusca, Gastropoda) and sediment from the Tunisian coast. Hydrobiologia, 714: 13-24.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol., 105: 121-126.

Alzieu, C. & M. Heral. 1984. Ecotoxilogical effects of organotin compounds on oyster culture. In: Ecotoxicological Testing for the Marine Environment; G. Persone & al. (ed.), Ghent & Inst. Mar. Scient. Res., Belgium, 2, pp. 187-196.

Alzieu, C. 1989. L'étain et les organoétains en milieu marin: biogéochimie et écotoxicologie (Tin and organotins in the marine environment: biogeochemistry and ecotoxicology). Rapports scient et tech de l'IFREMER, 17: 1-93.

Alzieu, C. 1998. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. Ocean. Coast. Manage., 40: 23-36.

Alzieu, C. 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. Sci. Total Environ., 258: 99-102.

Anastasiou, T., E. Chatzinikolaou, M. Mandalakis & C. Arvanitidis. 2015. Imposex status and organotin concentrations in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the port of Cagliari (Sardinia). 11th Panhellenic Symposium on Oceanography and Fisheries, Mytilene, Lesvos Island, Greece.

Antizar-Ladislao, B. 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. Environ. Int., 34: 292–308.

Axiak, V., A.J. Vella, D. Micallef & P. Chircop. 1995. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): the first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. Mar. Biol., 121: 685-691.

Axiak, V., D. Micallef, J. Muscat, A. Vella & B. Mintoff. 2003. Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. Environ. Int., 28: 743-749.

Banni, M., A. Negri, A. Dagnino, J. Jebali, S. Ameur & H. Boussetta. 2010. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotox. Environ. Safe., 79: 842-848.

Barreiro, R., M. Quintela & J.M. Ruiz. 1999. Aphally and imposex in *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): incidence, geographical distribution and consequences for the biomonitoring of TBT contamination. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 185: 229-238.

Barreiro, R., R. Gonzalez, M. Quintela and J.M. Ruiz. 2001. Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NM Spain. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 218: 203-212.

Barroso, C.M., M.H. Moreira & P.E. Gibbs. 2000. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). Mar. Ecol. - Prog. Ser., 201: 221-232.

Barroso, C.M. & M.H. Moreira. 2002. Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. Mar. Pollut. Bull., 44: 480-486.

Barroso, C.M., M.H. Moreira & M.J. Bebianno. 2002. Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 230: 127-135.

Batel, R. & T. Zvonarić. 2002. Razina i utjecaj onečišćenja na području većih naselja – "vruće točke". In: N. Smodlaka (ed.): Hrvatski nacionalni monitoring program "Sustavno istraživanje Jadranskog mora kao osnova održivog razvitka Republike Hrvatske", Projekt Jadran, Izvještaj 2001 (First draft). Rovinj. pp. 17-25.

Bauer, B., P. Fioroni, I. Ide, S. Liebe & J. Oehlmann. 1995. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: a possible indicator of tributyltin pollution. Hydrobiologia, 309: 15-27.

Bhagat, J., B.S. Ingole & N. Singh. 2016. Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. ISJ - Invert. Surviv. J., 13: 336-349.

Birchenough, A.C., S.M. Evans, C. Moss & R. Welch. 2002. Re-colonization and recovery of populations of dogwhelks *Nucella lapillus (L.)* on shores formerly subject to severe TBT contamination. Mar. Pollut. Bull., 44: 652-659.

Bocquené, G. & F. Galgani. 1991. L'acétylcholinésterase chez les organismes marins, outil de surveillance des effets des pesticides organophosphorés et carbamates. Océanis, 17: 439–448.

Boecklen, W.J., C.T. Yarnes, B.A. Cook & A.C. James. 2011. On the use of stable isotopes in trophic ecology. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 42: 411-440.

Boening, D.W. 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environ. Monit. Assess., 55: 459-470.

Boulajfene, W., J. Boukhicha, A. Deidun, D. Berto, T. Romeo, O.K. Ben Hassine & S. Tlig-Zouari. 2015. Biomonitoring of the environmental contamination by organotins in the Gulf of Tunis: occurrence of imposex in *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767). Mar. Freshwater Res., 66(9): 778-785. http://dx.doi.org/10.1071/MF13301.

Bray, S., E.C. McVean, A. Nelson, R.J.H. Herbert, S.J. Hawkins & M.D. Hudson. 2011. The regional recovery of *Nucella lapillus* populations from marine pollution, facilitated by man-made structures. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 92: 1585-1594.

Brosillon, S., C. Bancon-Montigny & J. Mendret. 2014. Study of photocatalytic degradation of tributyltin, dibutyltin and monobutyltin in water and marine sediments. Chemosphere, 109: 173-179.

Bryan, G.W., P.E. Gibbs, G.R. Burt & L.G. Hummerstone. 1987. The effect of tributyltin (TBT) accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 67: 525-544.

Buege, J.A. & S.D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol., 52: 302-310.

Burčul, B. 2015. Morfometrijska obilježja populacija dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) uz hrvatsku obalu Jadrana. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 63 pp.

Cairns, Jr. J. 1979. Biological Monitoring - Scope & Concept. In: J. Cairns, Jr., G.P. Patil & W.E. Waters (ed.): Environmental Biomonitoring, Assessment, Prediction and Management - Certain Case Studies and Related Quantitative Issues. International Cooperative Publishing House, Fairland, MD, pp. 3-20.

Camillo, E., J. Quadros, I.B. de Castro & M. Fernandez. 2004. Imposex in *Thais rustica* (Mollusca: Neogastropoda) (Lamark, 1822) as an indicator of organotin compounds pollution at Maceio coast (northeastern Brazil). Braz. J. Oceanogr., 52: 101-105.

Carballeira, A., E. Carral, X. Puente & R. Villares. 2000. Regional-scale monitoring of coastal contamination: Nutrients and heavy metals in estuarine sediments and organisms on the coast of Galicia (northwest Spain). Int. J. Environ. Pollut. 13: 534-572.

Careddu, G., M.L. Costantini, E. Calizza, P. Carlino, F. Bentivoglio, L. Orlandi & L. Rossi. 2015. Effects of terrestrial input on macrobenthic food webs of coastal sea are detected by stable isotope analysis in Gaeta Gulf. Estuar. Coast. Shelf Sci., 154: 158-168.

Carić, H., G. Klobučar & A. Štambuk. 2016. Ecotoxicological risk assessment of antifouling emissions in a cruise ship port. J. Clean. Prod., 121: 159-168.

Castro, I.B., C.E. Bemvenuti & G. Fillmann. 2007. Preliminary appraisal of imposex in areas under the influence of southern Brazilian harbours. J. B. S. E., 2: 73-79.

Castro, I.B., M. Rossato & G. Fillmann. 2012. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbours. Environ. Toxicol. Chem., 31: 947-954.

Cecalupo, A., M. Vianello & L. Perini. 2006. Alcune forme aberranti rinvenute nel Mare Adriatico di *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) e *Bolinus brandaris* (Linnaeus, 1758). Notiziario S.I.M., Pubblicazione Quadrimestrale della Societa` Italiana di Malacologia, 24 (5-8): 13–15.

Champ, M.A. 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. Sci. Total Environ., 258: 21-71.

Chiavarini, S., P. Massanisso, P. Nicolai, C. Nobili & R. Morabito. 2003. Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). Chemosphere, 50: 311-319.

Coe, W.R. 1944. Sexual differentiation in mollusks II. Gastropods, Amphineurans, Scaphopods, and Cephalopods. Q. Rev. Biol., 19: 85-97.

Cuevas, N., J. Ignacio, G. Alonso, J. Laretta, J. Germán Rodríguez, C. Sariego, I. Zorita. 2014. Monitoring the effectiveness of the European tributyltin regulation on the Basque coast (northern Spain) by assessing imposex in two gastropod species (*Nassarius reticulatus* and *Nassarius nitidus*). Chem. Ecol., 30: 636-642.

Commission Directive 1999/51/EC, 1999. Commission Directive adapting to technical progress for the fifth time Annex I to Council Directive 76/769/EEC on the approximations of the laws, regulations, and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (tin, PCP and cadmium). Official Journal of the European Communities, L 142.

Commission Directive 2002/62/EC, 2002. Commission Directive adapting to technical progress for the ninth time Annex I to Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (organostannic compounds). Official Journal of the European Communities, L 183.

Council Directive 76/769/EEC, 1976. Council Directive on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. Official Journal of the European Communities, L 262.

Council Directive 89/677/EEC, 1989. Council Directive amending for the eighth time Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. Official Journal of the European Communities, L 398.

Council Directive 2000/60/EC, 2000. EU Water Framework Directive. Official Journal of the European Communities, L 327.

Dagnino, A., J.I. Allen, M.N. Moore, K. Broeg, L. Canesi & A. Viarengo. 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. Biomarkers, 12: 155-172.

Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani & R. Colombo. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin. Chim. Acta, 329: 23-38.

De Mora, S.J., C. Stewart & D. Philips. 1995. Sources and rate of degradation of tri(n-butyl)tin in marine sediments near Auckland, New Zealand. Mar. Pollut. Bull., 30: 50-57.

Decision 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council establishing the list of priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Communities, 331.

Del Rio, D., A.J. Stewart & N. Pellegrini. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 15, 28–316.

Derbali, A., A. Hadj Taeib, W. Kammoun, O. Jarboui & M. Ghorbel. 2014. Mapping stocks and population structure of the cockle *Cerastoderma glaucum* in the littoral zone of Sfax (Tunisia, Central Mediterranean). Cah. Biol. Mar., 55: 353-361.

Deudero, S., A. Box, J. Alós, N.L. Arroyo & N. Marbà. 2011. Functional changes due to invasive species: Food web shifts at shallow *Posidonia oceanica* seagrass beds colonized by the alien macroalga *Caulerpa racemosa*. Estuar. Coast. Shelf S., 93: 106-116.

Dolenec, T., S. Lojen, G. Kniewald, M. Dolenec & N. Rogan. 2006. $\delta^{15}N$ of particulate organic matter and *Anemonia sulcata* as a tracer of sewage effluent transport in the marine coastal ecosystem of Pirovac Bay and the Murter Sea (Central Adriatic). RMZ-Mater. Geoenviron., 53: 1-13.

Dolenec, T., S. Lojen, G. Kniewald, M. Dolenec & N. Rogan. 2007. Nitrogen stable isotope composition as a tracer of fish farming in invertebrates *Aplysina aerophoba*, *Balanus perforatus* and *Anemonia sulcata* in central Adriatic. Aquaculture, 262: 237-249.

Dolenec, M., P. Žvab, G. Mihelčić, Ž. Lambaša Belak, S. Lojen, G. Kniewald, T. Dolenec & N. Rogan Šmuc. 2011. Use of stable nitrogen isotope signatures of anthropogenic organic matter in the coastal environment: A case study of the Kosirina Bay (Murter Island, Croatia). Geol. Croat., 64: 143-152.

Domouhtsidou, G.P. & V.K. Dimitriadis. 2001. Lysosomal and lipid alternations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. Environ. Pollut., 115: 123-137.

Dora, M., I. Guberović & M. Petras. 2012. Utjecaj polifenola iz vina i taloga koji nastaje tijekom pretakanja vina na antioksidacijski status u CBA miša. Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 65 pp.

Elhasni, K., P. Vasconcelos, M. Ghorbel & O. Jarboui. 2013. Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the Gulf of Gabes (southern Tunisia). Medit. Mar. Sci., 14: 24-35.

Ellman, G.L., K.D. Courtney, V.Jr. Andres & R.M. Feather-Stone 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., **7**: 88-95.

Elumalai, M., C. Antunes & L. Guilhermino. 2002. Single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. Water Air Soil Pollut., 141, 273–280.

Evans, S.M., T. Leksono & P.D. McKinnell. 1995. Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. Mar. Pollut. Bull., 30: 14-21.

Evans, S.M., P.M. Evans & T. Leksono. 1996. Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus (L.),* from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. Mar. Pollut. Bull., 32: 263-269.

Evans, S.M., E. Kerrigan & N. Palmer. 2000. Causes of imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus (L.)* and its use as a biological indicator of tributyltin contamination. Mar. Pollut. Bull., 40: 212-219.

Ezgeta Balić, D. 2013. Ishrana gospodarski važnih vrsta školjkaša u Malostonskom zaljevu. Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu i Sveučilište u Dubrovniku, 108 pp.

Ezgeta Balić, D., S. Lojen, T. Dolenec, P. Žvab Rožič, M. Dolenec, M. Najdek & M. Peharda. 2014. Seasonal differences of stable isotope composition and lipid content in four bivalve species from the Adriatic Sea. Mar. Biol. Res., 10 (6): 625-634. doi: 10.1080/17451000.2013.833338.

Fitzpatrick, P.J., D. Sheehan & D.R. Livingstone. 1995. Studies on isoenzymes of glutathione-S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. Mar. Environ. Res., 39:241-244.

Fry, B., A. Gace & J.W. McClelland. 2003. Chemical indicators of anthropogenic nitrogen loading in four Pacific estuaries. Pac. Sci., 57: 77–101.

Furdek, M., M. Vahčić, J. Ščančar, R. Milačić, G. Kniewald & N. Mikac. 2012. Organotin compounds in seawater and *Mytillus galloprovicialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. Mar. Pollut. Bull., 64: 189-199.

Furdek, M. 2015. Raspodjela i ponašanje organokositrovih spojeva u priobalnom moru istočnoga dijela Jadrana. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 196 pp.

Furdek, M., N. Mikac, M. Bueno, E. Tessier, J. Cavalheiro & M. Monperrus. 2016. Organotin persistence in contaminated marine sediments and porewaters: *In situ* degradation study using species-specific stable isotopic tracers. J. Haz. Mat., 307: 263-273.

Galante-Oliveira, S., I. Oliveira, N. Jonkers, W.J. Langston, M. Pacheco & C.M. Barroso. 2009. Imposex levels and tributyltin pollution in Ria de Aveiro (NW Portugal) between 1997 and 2007: evaluation of legislation effectiveness. J. Environ. Monitor., 11: 1405-1411.

Galante-Oliveira, S., I. Oliveira, J.A. Santos, M. de Lourdes Pereira, M. Pacheco & C.M. Barroso. 2010. Factors affecting RPSI in imposex monitoring studies using *Nucella lapillus* (L.) as bioindicator. J. Environ. Monitor., 12: 1055-1063.

Garaventa, F., F. Pellizzato, M. Faimali, A. Terlizzi, D. Medakovic, S. Geraci & B. Pavoni. 2006a. Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. Hydrobiologia, 555: 281-287.

Garaventa, F., M. Faimali & A. Terlizzi. 2006b. Imposex in pre-pollution times. Is TBT to blame? Mar. Pollut. Bull., 52: 701-702.

Garaventa, F., E. Centanni, F. Pellizzato, M. Faimali, A. Terlizzi & B. Pavoni. 2007. Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian coast (Croatia). Mar. Pollut. Bull., 54: 615-622.

George, S.G. 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes. In: Malins DC, Ostrander GK (ed.), Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, Boca Raton FL. pp. 37–85.

Gerhard, A. 2002. Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: UNESCO (ed.), Encyclopedia of Life Support Systems. Oxford (UK): UNESCO, EOLSS. 50 pp.

Gibbs, P.E., G.W. Bryan, P.L. Pascoe & G.R. Burt. 1987. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 67: 507-523.

Gibbs, P.E., P.L. Pascoe & G.R. Burt. 1988. Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 68: 715-731.

Gibbs, P.E. 1993. A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favoring survival in a TBT-polluted area. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 73: 667-678.

Gibbs, P.E. 1996. Oviduct malformation as a sterilizing effect of tributyltin (TBT)-induced imposex in *Ocenebra ericanea* (Gastropoda: Muricidae). J. Moll. Stud., 62: 403-413.

Gibbs, P.E. 2005. Male genital effect (Dumpton Syndrome) in the dog-whelk *Nucella lapillus* (Neogastropoda): Mendelian inheritance inferred, based on laboratory breeding experiments. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 85: 143-150.

Gofas, S., J. Le Renard & P. Bouchet. 2001. Mollusca. In: Costello, M.J. et al. (ed.), European Register of Marine Species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels. 50: 180-213.

Gomez-Ariza, J. L., E. Morales & I. Giraldez, 1999. Uptake and elimination of tributyltin in clams, *Venerupis decussata*. Mar. Environ. Res., 47: 399-413.

Guðmundsdóttir, L.Ó., K.K.Y. Ho, J.C.W. Lam, J. Svavarsson & K.M.Y. Leung. 2011. Long-term temporal trends (1992–2008) of imposex status associated with organotin contamination in the dogwhelk *Nucella lapillus* along the Icelandic coast. Mar. Pollut. Bull., 63: 500-507.

Habig, W.H., M.J. Pabst & W.B. Jakoby. 1974. Glutathione s-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249: 7130-7139.

Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge. 1999. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press; New York: Oxford University Press. Oxford. 936 pp.

Ho, K.K.Y. & K.M.Y. Leung. 2014. Spatio-temporal comparisons of imposex status and tissue organotin concentration in the whelk *Reishia clavigera* collected along the coasts of Dapeng Bay and Daya Bay, Shenzhen, China. Mar. Pollut. Bull., 85: 254-260.

Hoch, M. 2001. Organotin compounds in the environment - an overview. Appl. Geochem., 16: 719-743.

Horiguchi, T. 2012. Ecotoxicological impacts of organotins: An overview. In: A. Pagliarani, F. Trombetti and V. Ventrella (ed.). Biochemical and Biological Effects of Organotins. Bentham Science Publishers, pp. 3-24.

Huet, M., Y.M. Paulet & M. Le Pennec. 1996. Survival of *Nucella lapillus* in a tributyltin-polluted area in west Brittany: a further example of a male genital defect (Dumpton syndrome) favoring survival. Mar. Biol., 125: 543-549.

Huet, M., Y.M. Paulet & J. Clavier. 2004. Imposex in *Nucella lapillus*: a ten-year survey in NW Brittany. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 270: 153-161.

Hutchinson, T.H., B.P. Lyons, J.E. Thain & R.J. Law. 2013. Evaluating legacy contaminants and emerging chemicals in marine environments using adverse outcome pathways and biological effects-directed analysis. Mar. Pollut. Bull., 74: 517-525.

Ide, I., E.P. Witten, J. Fischer, W. Kalbfus, A. Zellner, E. Stroben & B. Watermann. 1997. Accumulation of organotin compounds in the common whelk *Buccinum undatum* and the red whelk *Neptunea antiqua* in association with imposex. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 152: 197-203.

Jakšić, Ž. 2002. Razvoj i primjena brze mikrometode određivanja i praćenja oštećenja DNA u škrgama dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 138 pp.

Jelić, K. 2007. Pojava imposeksa u vrste *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Sveučilišni studijski centar za studije mora, 32 pp.

Jia, X., Z. Zhang, S. Wang, P. Lin, Z. Zou, B. Huang & Y. Wang. 2009. Effects of tributyltin (TBT) on enzyme activity and oxidative stress in hepatopancreas and hemolymph of small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. Chinese J. Oceanol. Limnol., 27: 816-824., doi: 10.1007/s00343-009-9222-z.

Khessiba, A., P. Hoarau, M. Gnassia-Barelli, P. Aissa & M. Roméo. 2001. Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. Arch. Environ. Con. Tox., 40: 222-229.

Kim, N.A., W.J. Shim, U.H. Yim, S.H. Hong, S.Y. Ha, G.M. Han & K.H. Shin. 2014. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. Mar. Pollut. Bull., 78: 201-208.

Lahbib, Y., S. Abidli, M. Le Pennec, R. Flower & N.T. El Menif. 2007. Morphological expression and different stages of imposex in *Hexaplex trunculus* (Neogastropoda: Muricidae) from Tunisian coasts. Cah. Biol. Mar., 48: 315-326.

Lahbib, Y., S. Abidli & N.T. El Menif. 2008. Imposex level and penis malformation in *Hexaplex trunculus* from the Tunisian coast. Am. Malacol. Bull., 24 (1): 79-89.

Lahbib, Y., S. Abidli, J.F. Chiffoleau, B. Averty & N.T. El Menif. 2009a. First record of butyltin burden and imposex status in *Hexaplex trunculus (L.)* along the Tunisian coast. J. Environ. Monitor., 11: 1253-1258.

Lahbib, Y., A. Abidli & N. Trugui El Menif. 2009b. Relative growth and reproduction in Tunisian populations of *Hexaplex trunculus* with contrasting imposex levels. J. Shellfish Res., 28 (4): 891-898.

Lahbib, Y., S. Abidli, J.F. Chiffoleau, B. Averty & N.T. El Menif. 2010a. Imposex and butyltin concentrations in snails from the lagoon of Bizerta (Northern Tunisia). Mar. Biol. Res., 6: 600-607.

Lahbib, Y., S. Abidli & n. Trigui El Menif. 2010b. Laboratory study of the intracapsular development and juvenile growth of the banded murex, *Hexaplex trunculus*. J. World Aquac. Soc., 41: 18–34.

Lahbib, Y., S. Abidli, P. Rodriguez Gonzalez, J.I.G. Alonso & N.T. El Menif. 2011. Monitoring of organotin pollution in Bizerta Channel (Northern Tunisia): Temporal trend from 2002 to 2010. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 86: 531-534.

Lahbib, Y., S. Abidli & N.T. El Menif. 2012. TBT pollution in Tunisian coastal lagoons as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae). Transit. Water. Bull. 6:17–24.

Lahbib, Y., S. Abidli & N.T. El Menif. 2013. Description of Imposex and Butyltin Burden in *Nassarius mutabilis* from the Lagoon of Bizerta (northern Tunisia). Russ. J. Mar. Biol. 39: 70-75.

Lam, P.K.S. & J.S. Gray. 2001. Predicting effects of toxic chemicals in the marine environment. Mar. Pollut. Bull., 42: 169-173.

Lam, P.K.S. & J.S. Gray. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programs. Mar. Pollut. Bull., 46: 182-186.

Langston, W.J., G.W. Bryan, G.R. Burt & P.E. Gibbs. 1990. Assessing the impact of tin and TBT in estuaries and coastal regions. Funct. Ecol., 4: 433-443.

Langston, W.J., N.D. Pope, M. Davey, K.M. Langston, S.C.M. O'Hara, P.E. Gibbs & P.L. Pascoe. 2015. Recovery from TBT pollution in English Channel environments: A problem solved? Mar. Pollut. Bull., 95: 551-564.

Laranjeiro, F., P. Sánchez-Marín, S. Galante-Oliveira & C. Barroso. 2015. Tributyltin pollution biomonitoring under the Water Framework Directive: Proposal of a multi-species tool to assess the ecological quality status of EU water bodies. Ecol. Indic., 57: 525-535.

Levine, R.L., J.A. William, E.R. Stadtman & E. Shacter. 1994. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. Method. Enzymol., 233: 346-357.

Mahmoud, N., M. Dellali, P. Aissa & E. Mahmoudi. 2012. Acute toxicities of cadmium and permethrin on the pre-spawning and post-spawning phases of *Hexaplex trunculus* from Bizerta Lagoon, Tunisia. Environ. Monit. Assess., 184: 5851-5861.

Marín-Guirao, L., J. Lloret & A. Marin. 2008. Carbon and nitrogen stable isotopes and metal concentration in food webs from mining-impacted coastal lagoon. Sci. Tot. Environ., 393: 118-130.

Markert, B.A., A.M. Breure & H.G. Zechmeister. 2003. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: B.A Markert, A.M. Breure & H.G. Zechmeister (ed.), Bioindicators and biomonitors. Elsevier Science Ltd, pp. 3-40.

Marshall, D.J. & A. Rajkumar. 2003. Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbours. Mar. Pollut. Bull., 46: 1150-1155.

Martin, P.R. 2002. Evidence for parthenogenesis and natural imposex in the Patagonian freshwater snail *Heleobia hatcheri* (Gastropoda: Hydrobiidae). J. Mollus. Stud., 68: 292-295.

Marzouk, Z., A. Chenuil, H. Blel & K. Saïd. 2016. Morphometric variation of fishery-exploited muricidae (*Hexaplex trunculus)* in the Mediterranean Sea and the northeastern Atlantic ocean: Implications for stock identification. Turk. J. Fish Aquat. Sci., 16: 327-338.

Mensink, B.P., H. Kralt, A. Dick Vethaak, C.C. Ten Hallers-Tjabbes, J.H. Koeman, B. Hattum & J.P. Boon. 2002. Imposex induction in laboratory reared juvenile *Buccinum undatum* by tributyltin (TBT). Environ. Toxicol. Phar., 11: 49-65.

Michener, R.H. & L. Kaufman. 2007. Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: An update. In: Michener, R. & K. Lajtha (ed.), Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Publishing Ltd, pp. 238-282.

Milivojevič Nemanič, T., R. Milačič & J. Ščančar. 2009. A survey of organotin compounds in the northern Adriatic Sea. Water Air Soil Pollut., 196: 211-224.

Minagawa, M. & E. Wada. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. Geochim. Cosmochim. Acta, 48: 1135-1140.

Mutlu, E. 2013. Morphometry and areal growth cohorts of common epifaunal species on a sand bottom of the Cilician shelf (Turkey), Mediterranean Sea. J. A. B. S., 7: 42-63.

Narodne novine. 2005. Pravilnik o uvjetima i načinu održavanja reda u lukama i na ostalim dijelovima unutarnjih morskih voda i teritorijalnog mora RH. Narodne novine broj 90/2005, 10/2008, 155/2008, 127/2010, 80/2012, 7/2017.

Narodne novine. 2006. Lista opasnih kemikalija čiji je promet zabranjen odnosno ograničen. Narodne novine broj 17/2006.

Narodne novine - Međunarodni ugovori. 2006. Zakon o potvrđivanju Međunarodne konvencije o nadzoru štetnih sustava protiv obraštanja brodova. Narodne novine - Međunarodni ugovori broj 10/2006.

Narodne novine. 2013. Uredba o standardu kakvoće voda. Narodne novine broj 73/2013, 151/2014, 78/2015, 61/2016.

Nias, D.J., S.C. McKillup & K.S. Edyvane. 1993. Imposex in *Lepsiella vinosa* from Southern Australia. Mar. Pollut. Bull., 26: 380-384.

Nicolaus, E.E.M. & J. Barry. 2015. Imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*): 22 years monitoring around England and Wales. Environ. Monit. Assess. 187:736.

Noventa, S. 2010. Effects of organic and metallorganic pollutants on European gastropod species. Doktorska disertacija, Università Ca' Foscari Venezia, 184 pp.

Oehlmann, J., E. Stroben, U. Schulte-Oehlmann & B. Bauer. 1998a. Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). Aquat. Toxicol., 43: 239-260.

Oehlmann, J., B. Bauer, D. Minchin, U. Schulte-Oehlmann, P. Fioroni & B. Markert. 1998b. Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. Hydrobiologia, 378: 199-213.

Omae, I. 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. Appl. Organomet. Chem., 17: 81-105.

OSPAR. 2004. OSPAR/ICES Workshop on the evaluation and update of background reference concentrations (B/RCs) and ecotoxicological assessment criteria (EACs) and how these assessment tools should be used in assessing contaminants in water, sediment and biota, Final report, OSPAR Commission.

Payne, J.F., A. Mathieu, W. Melvin & L.L. Fancey. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Mar. Pollut. Bull. 32: 225–231.

Peharda, M. & B. Morton. 2006. Experimental prey species preferences of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae) and predator–prey interactions with the Black mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae). Mar. Biol., 148: 1011-1019.

Pelizzato, F., E. Centanni, M.G. Marin, V. Moschino & B. Pavoni. 2004. Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. Sci. Total Environ., 332: 89-100.

Petrović, S., L. Semenčić, B. Ozretić & M. Ozretić. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). Mar. Pollut. Bull., 49: 713-720.

Pope, N.D. 1998. The bioavailability of sediment-bound tributyltin (TBT). Doktorska disertacija, University of Plymouth, Faculty of science, Department of biological sciences, 258 pp.

Pougnet, F., J. Schäfer, L. Dutruch, C. Garnier, E. Tessier, D.H. Dang, L. Lanceleur, J.U. Mullot, V. Lenoble & G. Blanc. 2014. Sources and historical record of tin and butyltin species in a Mediterranean bay (Toulon Bay, France). Eviron. Sci. Pollut. Res., 21: 6640-6651.

Prime, M., M. Peharda, K. Jelić, I. Mladineo & C.A. Richardson. 2006. The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic. Mar. Pollut. Bull., 52: 810-812.

Primost, M.A., G. Bigatti & F. Márquez. 2016. Shell shape as indicator of pollution in marine gastropods affected by imposex. Mar. Freshwater Res., 67: 1948-1954.

Ramon, M. & M.J. Amor. 2001. Increasing imposex in populations *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. Mar. Environ. Res., 52: 463-475.

Ramos-Martinez, J.I., T.R. Bartolomé & R.V. Pernas. 1983. Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Phys. B, 75: 689-692.

Rato, M., M. B. Gaspar, S. Takahashi, S. Yano, S. Tanabe & C. Barroso. 2008. Inshore/offshore gradients of imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along Portuguese coast. Mar. Pollut. Bull., 56: 1323-1331.

Regulation (EC) No 782/2003, 2003. Regulation of the European Parliament and of the Council of 14 April 2003 on the prohibition of organotin compounds on ships. Official Journal L 115.

Rees, C. M., A. Brady & G. J. Fabris. 2001. Incidence of imposex in *Thais orbita* from Port Phillip bay (Victoria, Australia), following 10 years of regulation on use of TBT. Mar. Pollut. Bull., 42: 873-878.

Regoli, F. & G. Principato. 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquat. Toxicol., 31: 143-16.

Richardson, B.J., E. Mak, S.B. De Luca-Abbott, M. Martin & K. McClellan. 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels ‘‘integrate” biomarker responses? Mar. Pollut. Bull., 57: 503-514.

Rilov, G., A. Avital, S. M. Evans & Y. Benayahu. 2000. Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 192: 229-238.

Rilov, G.A., Y. Benayahu & A. Gasith. 2004. Life on the edge: do biomechanical and behavioral adaptations to wave-exposure correlate with habitat partitioning in predatory whelks? Mar. Ecol. - Prog. Ser., 282: 193-204.

Roméo, M., S. Gharbi-Bouraoui, M. Gnassia-Barelli, M. Dellali & P. Aissa. 2006. Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. Sci. Total Environ. 359: 135-144.

Rüdel, H. 2003. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. Ecotox. Environ. Safe., 56: 180-189.

Sabolić, I. 2016. Procjena izloženosti dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) onečišćenju mora upotrebom biomarkera oksidativnog stresa. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 69 pp.

Sanchez, W., T. Burgeot & O. Perceval. 2012. Perspectives from the French workshop on the development and validation of biomarkers and bioassays for the monitoring of aquatic environments. Environ. Sci. Pollut. Res., 19 (4): 1345-1347.

Schulte-Oehlmann, U., J. Oehlmann, P. Fioroni & B. Bauer. 1997. Imposex and reproductive failure in *Hydrobia ulvae* (Gatropoda: Prosobranchia). Mar. Biol., 128: 257-266.

Scott, G.I., M.H. Fulton, S.B. Weisberg, K.A. Maruya & G. Lauenstein. 2012. Contaminants of concern in the marine environment: the need for new monitoring and assessment strategies. J. Mar. Biol. Oceanogr., 1:1. doi:10.4172/2324-8661.1000e102.

Sheehan, D. & A. Power. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defense mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Phys. C, 123: 193-199.

Shi, H.H., C.J. Huang, S.X. Zhu, X.J. Yu & W.Y. Xie. 2005. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. Mar. Ecol. - Prog. Ser., 304: 179-189.

Smith, B.S. 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. J. Mollus. Stud., 39: 377-378.

Smith, B.S. 1981a. Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. J. Appl. Toxicol., 1: 15-21.

Smith, B.S. 1981b. Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. J. Appl. Toxicol., 1: 22-25.

Smith, B.S. 1981c. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus = Ilyanassa obsolete*. J. Appl. Toxicol., 1: 141-144.

Solé, M., Y. Morcillo & C. Porte. 1998. Imposex in commercial snail *Bolinus brandaris* in the northwestern Mediterranean. Environ. Pollut., 99: 241-246.

Son, M.H. & R.N. Hughes. 2000. Relationship between imposex and morphological variation of the shell in *Nucella lapillus* (Gastropoda: Thaididae). Estuar. Coast. Shelf S., 50: 599-606.

Spence, S.K., G.W. Bryan, P.E. Gibbs, D. Masters, L. Morris & S.J. Hawkins. 1990. Effects of TBT contamination on *Nucella* populations. Funct. Ecol., 4: 425-432.

Stagličić, N., M. Prime, M. Zoko, Ž. Erak, D. Brajčić, D. Blažević, K. Madirazza, K. Jelić & M. Peharda. 2008. Imposex incidence in *Hexaplex trunculus* from Kaštela Bay, Adriatic Sea. Acta Adriat., 49: 159-164.

Stewart, C. & S.J. De Mora. 1990. A review of the degradation of tri(n butyl)tin in marine environment. Environ. Technol., 11: 565-570.

Stewart, C., S.J. De Mora, M.R.L. Jones & M.C. Miller. 1992. Imposex in New Zealand Neogastropods. Mar. Pollut. Bull., 24: 204-209.

Strand, J. & J.A. Jacobsen. 2005. Accumulation and tropic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. Sci. Total Environ., 350: 72-85.

Stroben, E, J. Oehlmann & P. Fiorini. 1992. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential biological indicator of tribytiltin pollution. Mar. Biol., 113: 625-636.

Suzdalev, S., S. Gulbinskas & N. Blažauskas. 2015. Distribution of tributyltin in surface sediments from transitional marine-lagoon system of the south-eastern Baltic Sea, Lithuania. Environ. Sci. Pollut. Res., 22: 2634–2642., doi:10.1007/s11356-014-3521-4.

Swennen, C., U. Sampantarak & N. Ruttanadakul. 2009. TBT-pollution in the Gulf of Thailand: A re-inspection of imposex incidence after 10 years. Mar. Pollut. Bull., 58: 526-532.

Štambuk, A. 2011. Utjecaj onečišćenja na genetičku raznolikost populacija dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 149 pp.

Štambuk, A., M. Šrut, Z. Šatović, M. Tkalec & G.I.V. Klobučar. 2013. Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. Aquat. Toxicol., 136-137: 22-31.

Terlizzi, A., S. Geraci & V. Minganti. 1998. Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of Italy as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae). Mar. Pollut. Bull., 36: 749-752.

Terlizzi, A., S. Geraci & P.E. Gibbs. 1999. Tributyltin (TBT) induced imposex in the neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. Ital. J. Zool., 66: 141-146.

Terlizzi, A., S. Fraschetti, P. Gianguzza, M. Faimali & F. Boero. 2001. Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. Aquat. Conserv., 11: 311-317.

Terlizzi, A., A.L. Delos, F. Garaventa, M. Faimali & S. Geraci. 2004. Limited effectiveness of marine protected areas: imposex in *Hexaplex trunculus* (Gatropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. Mar. Pollut. Bull., 48: 188-192.

Tirado, C., A. Rodríguez, M.A. Bruzón, J.I. López, C. Salas & I. Márquez I. 2002. La reproducción de bivalvos y gasterópodos de interés pesquero en Andalucía (Reproduction of bivalves and gastropods owning an fishing interest in Andalusia). Ministarstvo poljoprivrede i ribarstva, Andaluzija, Sevilla, Španjolska, 129 pp.

Titley-O'Neal, C.P., K.R. Munkittrick & B.A. MacDonald. 2011. The effect of organotin on female gastropods. J. Environ. Monit., 13: 2360-2388.

UNEP/RAMOGE, 1999: Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP. Athens. 39 pp.

USEPA. 2003. Ambient aquatic life water quality criteria for tributyltin (TBT) - Final. U.S. Environmental protection agency; Office of water, Office of science and technology, Health and ecological criteria division. Washington D.C. http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/tributyltin/fs-final.cfm

Vasconcelos, P., M.B. Gaspar & M. Castro. 2006a. Imposex in *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) from the Ria Formosa lagoon (Algarve coast – southern Portugal). Mar. Pollut. Bull., 52: 337-341.

Vasconcelos, P., M.B. Gaspar, A.M. Pereira, M. Castro. 2006b. Growth rate estimation of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) based on mark/recapture experiments in the Ria Formosa lagoon (Algarve coast, southern Portugal). J. Shellfish R., 25: 249-256.

Vasconcelos, P., M.B. Gaspar & M. Castro. 2006c. Development of indices for nonsacrifical sexing of imposex-affected *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae). J. Mollus. Stud., 72: 285-294.

Vasconcelos, P., J. Cúrdia, M. Castro & M.B. Gaspar. 2007. The shell of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) as a mobile hard substratum for

epibiotic polychaetes (Annelida: Polychaeta) in the Ria Formosa (Algarve coast - southern Portugal). Hydrobiologia, 575: 161-172.

Vasconcelos, P., B. Lopes, M. Castro & M.B. Gaspar. 2008. Gametogenic cycle of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) in the Ria Formosa lagoon (Algarve coast, southern Portugal). J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 88(02): 321-329.

Vasconcelos, P., C.M. Barroso & M.B. Gaspar. 2016. Morphometric relationships and relative growth of *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) from the Ria Formosa lagoon (southern Portugal). J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 96(7): 1417-1425.

Viglino, L., E. Pelletier & L.E.J. Lee. 2006. Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay fjord (Canada) and imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). Arch. Environ. Con. Tox., 50: 45-59.

Ward, T.J. 1987. Temporal variation of metals in the seagrass *Posidonia australis* and its potential as a sentinel accumulator near a lead smelter. Mar. Biol., 95: 315-321.

WFD-UKTAG. 2014. UKTAG Coastal Water Assessment Method – Benthic Invertebrate Fauna. Assessment of imposex in *Nucella lapillus*. Water Framework Directive – United Kingdom Technical Advisory Group.

Winston, G.W. & R.T. Di Giulio. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol., 19: 137-161.

Young, I.S. & J.V. Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. J. Clin. Pathol., 54: 176-186.

Zavodnik, D. & A. Šimunović. 1997. Beskralješnjaci morskog dna Jadrana. Svjetlost, Sarajevo, 217 pp.

Zhou, Q., J. Zhang, J. Fu, J. Shi & G. Jiang. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Anal. Chim. Acta, 606: 135-150.

Župan, I., M. Peharda, T. Dolenec, M. Dolenec, P. Žvab Rožič, S. Lojen, D. Ezgeta Balić & J. Arapova. 2014. Aquaculture assessment of Noah's ark (*Arca noae* Linnaeus, 1758) in the central Adriatic sea (Croatia). J. Shellfish Res., 33(2): 433-441.

ŽIVOTOPIS AUTORA

Anita Erdelez rođena je 5. ožujka 1974. godine u Zadru. Nakon završene Matematičke gimnazije u Šibeniku, akademske godine 1992/1993. upisuje diplomski studij Građevinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, gdje završava opći smjer i stječe naziv diplomirani inženjer građevinarstva. Diplomski rad pod naslovom „Sanacija odlagališta komunalnog otpada Karepovac", pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Jure Margete, obranila je dana 30. travnja 1998. godine. U školskoj godini 2000/2001. na Građevinsko-arhitektonskom fakultetu Sveučilišta u Splitu upisuje poslijediplomski znanstveni studij građevinarstva – hidrotehnički smjer. Nakon položenih svih ispita dana 17. veljače 2006. godine obranila je znanstveni magistarski rad pod naslovom „Optimalizacija sustava prikupljanja komunalnog otpada", pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Jure Margete i komentorice prof.dr.sc. Snježane Knezić, te stječe akademski stupanj magistar znanosti iz područja tehničkih znanosti, znanstveno polje građevinarstvo, grana hidrotehnika. Međusveučilišni poslijediplomski doktorski studij „Primijenjene znanosti o moru" pri Sveučilištu u Splitu i Sveučilištu u Dubrovniku upisuje u akademskoj godini 2012/2013. te nakon položenih svih ispita, pod vodstvom mentorice prof.dr.sc. Melite Peharda Uljević i komentorice doc.dr.sc. Anamarije Štambuk, izrađuje ovu doktorsku disertaciju.

Od 1998. do 2017. godine radi u Odjelu za ekologiju Instituta IGH d.d., u Regionalnom centru Split. Od kolovoza 2017. godine zaposlena je u konzultantskoj tvrtci Fidon d.o.o. Nakon što je 2003. godine položila stručni ispit postaje član Hrvatske komore inženjera građevinarstva kao ovlašteni inženjer građevinarstva. Voditelj je izrade niza studija utjecaja na okoliš, elaborata zaštite okoliša i planova gospodarenja otpadom, projektant je sanacije više odlagališta otpada te nadzorni inženjer za kontrolu provedbe mjera zaštite okoliša tijekom izgradnje nekoliko građevinskih zahvata.

Tijekom 2004. godine pet tjedana je boravila na stručnom usavršavanju iz procjene utjecaja na okoliš i strateške procjene utjecaja na okoliš u Švedskoj u organizaciji tvrtke Ramboll Natura AB i Regionalnog centra zaštite okoliša za Srednju i Istočnu Europu (REC) pod pokroviteljstvom i sponzorstvom švedske vladine agencije Swedish International Development Cooperation Agency (SIDA). Tijekom istraživanja za potrebe izrade ove doktorske disertacije u 2014. i 2015. godini provela je dva mjeseca u Laboratoriju za ribarstvenu biologiju, gospodarenje pridnenim i pelagičkim naseljima Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu te tjedan dana u Laboratoriju za ekotoksikologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Koautor je jednog znanstvenog rada u časopisu indeksiranom u Current Content bazi i dva rada u časopisima

s međunarodnom recenzijom. Sudjelovala je na više domaćih i međunarodnih skupova s ukupno 13 radova.

Popis radova

Znanstveni radovi objavljeni u CC časopisima:

Erdelez A., M. Furdek Turk, A. Štambuk, I. Župan & M. Peharda. 2017. Ecological quality status of the Adriatic coastal waters evaluated by the organotin pollution biomonitoring. Mar. Pollut. Bull., 123 (1-2): 313-323.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom:

Erdelez, A. & I. Katavić. 2015. Mjesto i uloga strateške procjene utjecaja na okoliš u integralnom upravljanju obalnim područjem Republike Hrvatske. Naše more, 62: 26-35.

Erdelez, A., J. Margeta & S. Knezić. 2007. Integralni pristup upravljanju sustavom prikupljanja komunalnog otpada. Građevinar, 59 (6): 505-516.

Radovi na znanstvenim i stručnim skupovima objavljeni u zbornicima skupova:

Erdelez A., M. Furdek Turk, A. Štambuk, I. Župan & M. Peharda. 2017. Korištenje volka *Hexaplex trunculus* u praćenju onečišćenja hrvatskih luka TBT-om. U: Brkić, M. (ed.), Zbornik sažetaka radova Treće regionalne konferencije o procjeni utjecaja na okoliš. Hrvatska udruga stručnjaka zaštite prirode i okoliša. pp. 146-147.

Perović, Z. & **A. Erdelez.** 2017. Primjena metodologije kombiniranog pristupa: ispuštanje pročišćenih otpadnih voda aglomeracije Rab u priobalno more. U: Brkić, M. (ed.), Zbornik sažetaka radova Treće regionalne konferencije o procjeni utjecaja na okoliš. Hrvatska udruga stručnjaka zaštite prirode i okoliša. pp. 60-61.

Erdelez, A., Z. Perović & L. Končurat. 2016. Uključivanje utjecaja klimatskih promjena u procjenu utjecaja na okoliš infrastrukturnih zahvata u Republici Hrvatskoj. U: Lakušić, S. (ed.), Zbornik Sabora hrvatskih graditelja 2016 – EU i hrvatsko graditeljstvo. Hrvatski savez građevinskih inženjera. pp. 743-755.

Šrut, M., A. Štambuk, **A. Erdelez**, D. Polović, M. Furdek, M. Peharda & G. Klobučar. 2015. Utjecaj obalnog onečišćenja na epigenetiku i reproduktivni fitnes volka *Hexaplex trunculus*. U: Klobučar, G., N. Kopjar, M. Gligora Udovič, Ž. Lukša & D. Jelić (ed.),

Zbornik sažetaka 12. Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Hrvatsko biološko društvo. pp. 48.

Perović, Z., N. Ravlić, **A. Erdelez** & M. Lončar. 2008. Methodology of the environmental impact assessment of the coastal sewerage systems - Jadran project. U: Avanzini, C. (ed.), Proceedings of the Fifth International Conference on Marine Wastewater Discharges 2008. MWWD Organization. 15 pp.

Dorić, V. & **A. Erdelez**. 2008. Izbor optimalne trase spojne ceste Kaštel Kambelovac - čvor Vučevica s obzirom na okoliš. U: Simović, V. (ed.), Zbornik radova Sabora hrvatskih graditelja 2008 - Hrvatsko graditeljstvo pred izazovom europskih integracija. Hrvatski savez građevinskih inženjera. pp. 23-34.

Perović, Z. & **A. Erdelez**. 2008. Primjena modela širenja zračnog onečišćenja pri procjeni utjecaja na okoliš planiranih zahvata. U: Simović, V. (ed.), Zbornik radova Sabora hrvatskih graditelja 2008 - Hrvatsko graditeljstvo pred izazovom europskih integracija. Hrvatski savez građevinskih inženjera. pp. 1149-1158.

Erdelez, A., J. Margeta & S. Knezić. 2006. Racionalizacija sustava prikupljanja otpada otoka Brača. U: Milanović, Z. (ed.), Zbornik radova IX. Međunarodnog simpozija gospodarenja otpadom Zagreb 2006. Kongresni servis d.o.o. pp 995-1008.

Miličić, J., **A. Erdelez** & A. Pavlović. 2004. Regionalni centar za gospodarenje komunalnim otpadom u Dalmaciji. U: Simović, V. (ed.), Zbornik radova Sabora hrvatskih graditelja. Hrvatski savez građevinskih inženjera. pp. 1111-1118.

Miličić, J., N. Štambuk Cvitanović, **A. Erdelez** & A. Pavlović. 2002. Istražni radovi na odlagalištu Karepovac. U: Milanović, Z. (ed.), Zbornik radova VII. Međunarodnog simpozija gospodarenja otpadom Zagreb 2002. MTG-Topograf d.o.o. pp. 367-380.

Miličić, J., **A. Erdelez** & A. Pavlović. 2002. Odlagalište otpada Karepovac - preuređenje i prenamjena. U: Milanović, Z. (ed.), Zbornik radova VII. Međunarodnog simpozija gospodarenja otpadom Zagreb 2002. MTG-Topograf d.o.o. pp. 381-394.

Miličić, J., **A. Erdelez** & A. Pavlović. 2002. Rješenje problema komunalnog krutog otpada u obalnom području Republike Hrvatske. U: Milanović, Z. (ed.), Zbornik radova VII. Međunarodnog simpozija gospodarenja otpadom Zagreb 2002. MTG-Topograf d.o.o. pp. 99-114.

Aleardi, S., A. Treu & **A. Erdelez**. 2000. Karakteristike stabilata dobivenog MBO postupkom i njegova upotreba. U: Milanović, Z. (ed.), Zbornik radova VI. Međunarodnog simpozija gospodarenja otpadom Zagreb 2000. MTG-Topograf d.o.o. pp. 143-153.