

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

GINTARĖ SAULIUTĖ

**SUNKIŲJŲ METALŲ KAUPIMASIS ŽUVYSE, VEIKIANT JAS
DAUGIANARIAIS METALŲ MIŠINIAIS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, Ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2013–2017 metais Gamtos tyrimų centre.

Mokslinis vadovas – dr. Gintaras Svecevičius (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B). 2013.10.01 – 2016.09.30.

Mokslinis vadovas – dr. Tomas Virbickas (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B). 2016.10.01 – 2017.09.30.

TURINYS

PAGRINDINIAI TERMINAI IR SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Metalų vaidmuo organizme	14
1.2. Žuvis ekotoksikologiniuose tyrimuose	15
1.3. Metalų bioakumuliacija	18
1.4. Žuvų audinių specifiškumas metalų kaupimosi procese	22
1.5. Vandens hidrocheminių rodiklių įtaką metalų biologiniam įsisavinamumui	25
1.6. Žuvų žiaunos kaip biotinis ligandas	27
1.7. Metalo patekimo-bioakumuliacijos-šalinimo mechanizmas žuvų organizme	31
1.7.1 Cinkas	31
1.7.2 Varis	32
1.7.3 Nikelis	34
1.7.4 Chromas	36
1.7.5 Švinas	38
1.7.6 Kadmis	40
1.8. Metalų reglamentavimas	43
1.8.1 Reglamentuojamos SM normos Lietuvos paviršiniuose vandens telkiniuose	43
1.8.2 Reglamentuojamos SM normos žuvininkystės produktuose	45
1.9. Metalų mišinių rizikos vertinimas	47
1.10. Metalų mišinių poveikis žuvis. Eksperimentinių tyrimų apžvalga ..	51
1.11. Apibendrinimas	58
2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI	60
2.1. Tyrimo objektas	60
2.2. Tyrimo struktūra	62
2.3. Metalų kaupimosi gamtinėje aplinkoje gyvenančiose žuvyse tyrimas .	63

2.3.1 Metalų kaupimosi Kairių sąvartyno hidroekosistemoje gyvenančių žuvų audiniuose tyrimas	63
2.3.2 Metalų kaupimosi Vilnios ir Siesarties upių lašišų audiniuose tyrimas	65
2.4. Metalų kaupimosi žuvų audiniuose eksperimentiniai tyrimai.....	67
2.4.1 Eksperimentinės sistemos parinkimas	68
2.4.2 Optimalios ekspozicijos trukmės nustatymas	70
2.4.3 Metalų kaupimosi dėsningumų tyrimas skirtingų žuvų rūšių audiniuose	70
2.4.4 Metalotioneinų koncentracijos skirtingų žuvų rūšių audiniuose tyrimas	72
2.5. Metalų ir metalotioneinų koncentracijos žuvų audiniuose nustatymo metodika.....	72
2.6. Statistinė analizė.....	73
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	75
3.1. Metalų kaupimosi gamtinėje aplinkoje gyvenančiose žuvyse tyrimas .	75
3.1.1 Metalų kaupimasis Kairių sąvartyno hidroekosistemoje gyvenančių žuvų audiniuose	75
3.1.2 Metalų kaupimasis Vilnios ir Siesarties upių lašišų audiniuose	78
3.1.3 Rezultatų aptarimas.....	81
3.2. Metalų kaupimasis žuvų audiniuose eksperimentinėmis sąlygomis	83
3.2.1 Eksperimentinės sistemos parinkimas	83
3.2.2 Optimalios ekspozicijos trukmės nustatymas	85
3.2.2.1 Rezultatų aptarimas	90
3.2.3 Metalų kaupimosi dėsningumų tyrimas skirtingų žuvų rūšių audiniuose	92
3.2.3.1 SM kaupimasis <i>S. salar</i> audiniuose	92
3.2.3.2 SM kaupimasis <i>R. rutilus</i> audiniuose	97
3.2.3.3 SM kaupimasis <i>P. fluviatilis</i> audiniuose	102
3.2.3.4 Rezultatų palyginimas	107
3.2.3.5 Rezultatų aptarimas	113

3.2.4 Metalotioneinų koncentracija žuvų audiniuose po ekspozicijos	
daugianariame metalų mišinyje	120
IŠVADOS	124
LITERATŪROS SĄRAŠAS	126
PUBLIKCIJŲ SĄRAŠAS	137
KONFERENCIJOS	139
FINANSAVIMAS	141
PADĖKOS	141

PAGRINDINIAI TERMINAI IR SANTRUMPOS

Afinitetas (angl. *affinity*) – tai tendencija ligandui prisijungti prie receptoriaus (Giulio and Hinton, 2008).

ATP (adenozin 5-trifosfatas, C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃) – vienas pagrindinių ląstelės makroenergetinių junginių (Daušas ir kt., 2003).

ATPazė – fermentas, verčiantis H⁺ (arba kurio nors kito jono) elektrocheminio gradiento energiją cheminės jungties energija ir atvirkščiai (Daušas ir kt., 2003).

Bioakumuliacija – tai procesas, kurio metu sunkieji metalai kaupiasi žuvų organizme jiems patenkant dviem pagrindiniais keliais: *tiesiogiai* – per žiaunas ir kūno paviršių (biokoncentracija) ir *netiesiogiai* – per maistą (biomagnifikacija) (Van der Oost et al., 2003).

Biologinis įsisavinamumas (angl. *bioavailability*) – tai cheminės medžiagos įsisavinimo ir pasiskirstymo organizme mastas. Jis priklauso nuo medžiagos fizinių bei cheminių savybių, organizmo anatomijos ir fiziologijos, farmakokinetikos ir poveikimo būdo. Prieinamumas nėra biologinio įsisavinamumo būtina išankstinė sąlyga (Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008).

DLK (didžiausia leidžiama koncentracija) – tai reglamente arba kituose teisės aktuose nustatyta didžiausia leidžiama tam tikro teršalo ar teršalų grupės koncentracija nuotekose, vandens telkinyje, nuosėdose ar biotoje (LR Nuotekų tvarkymo reglamentas, Žin., 2006, Nr. 59-2103).

Foninė koncentracija – tai natūraliai paviršiniuose vandens telkiniuose egzistuojanti cheminių medžiagų koncentracija.

Homeostazė – paslanki kurios nors sistemos pusiausvyros būseną, kuri laikosi tol, kol sistema priešinasi tą pusiausvyrą trikdančioms išoriniams ir vidiniams veiksniams (Daušas ir kt., 2003).

Kofaktorius (angl. *cofactor*) – į fermento sudėtį įeinanti nebaltyminės kilmės, nedidelės molekulinės masės organinė medžiaga arba jonas, kuri būtina fermento veikimui. (Daušas ir kt., 2003).

L – žuvų bendras ilgis.

l – žuvų standartinis ilgis.

l_c – žuvų kaudalinis ilgis (lašišinių žuvų kūno ilgis matuojamas nuo snukio pradžios iki uodeginio peleko iškirptės centro (angl. *fork length*)).

Ligandas (angl. *ligand*) – molekulė ar jonas, kompleksiniame junginyje susijungęs koordinaciniu ryšiu su centriniu atomu (Daukšas ir kt., 2003).

Metabolizmas – medžiagų apykaita. Cheminių reakcijų, vykstančių kiekvienoje ląstelėje, visuma (Daukšas ir kt., 2003).

Metalotioneinai (MT) (angl. *metallothioneins*) – mažos molekulinės masės proteinais, gebantys prisijungti metalus (Zn, Cu, Cd, Hg, Ag ir kt.) (Vasak 2005).

MIX – metalų mišinys, kuriame visų 6-ių eksperimente naudojamų metalų koncentracijos atitinka DLK, reglamentuojamą ES vidaus vandenyse (2000/60/EC).

Priešingos krypties metalų kiekių pokytis – tai dviejų metalų kaupimosi žuvų audiniuose priešingo pobūdžio pokyčiai (sumažėjimas/padidėjimas arba atvirkščiai), veikiant **SM*0,1** mišiniais, kuriuose vieno iš metalų koncentracija yra sumažinta (pvz., vieno iš dviejų konkrečių metalų koncentraciją mišinyje sumažinus 10 kartų, antrojo metalo kaupimasis žuvų audiniuose *sumažėja*, tačiau sumažinus antrojo metalo koncentraciją mišinyje, pirmojo metalo kaupimasis audiniuose *padidėja*).

Q – žuvų bendras svoris.

q – žuvų svoris be vidaus organų.

Reoreakcija (angl. *rheotaxis*) – tai žuvų gebėjimas jausti ir reaguoti į vandens tekėjimo greitį ir kryptį.

SM – sunkusis metalas.

SM*0,1 – sunkiųjų metalų mišiniai (Zn*0,1; Cu*0,1; Ni*0,1; Cr*0,1; Pb*0,1; Cd*0,1), kuriuose vieno iš 6-ių metalų DLK sumažinta 10 kartų.

Vienašališkas metalo kiekio pokytis – tai tik vieno iš dviejų konkrečių metalų kaupimosi žuvų audiniuose pokytis (sumažėjimas arba padidėjimas), sumažinus kito metalo koncentraciją daugianariame mišinyje (pirmojo iš metalų koncentracijos sumažinimas mišinyje sukelia antrojo metalo kaupimosi

audiniuose pokyčius, tačiau antrojo iš metalų koncentracijos sumažinimas mišinyje nesukelia pirmojo metalo kaupimosi audiniuose pokyčių).

Vienodos krypties metalų kiekių pokytis – tai dviejų metalų kaupimosi žuvų audiniuose tokio paties pobūdžio pokyčiai (sumažėjimas/sumažėjimas arba padidėjimas/padidėjimas), veikiant žuvis **SM*0,1** mišiniais, kuriuose vieno iš metalų koncentracija yra sumažinta (pvz., vieno iš dviejų konkrečių metalų koncentraciją mišinyje sumažinus 10 kartų, antrojo metalo kaupimasis žuvų audiniuose *sumažėja*, o sumažinus antrojo metalo koncentraciją mišinyje, pirmojo metalo kaupimasis audiniuose taip pat *sumažėja*).

ĮVADAS

Darbo aktualumas. Sunkieji metalai (SM) itin plačiai naudojami žmogaus ūkinėje veikloje, todėl priskiriami įprastiniams hidroekosistemų teršalams. Dėl gebėjimo akumuliuotis organizmų audiniuose, SM kelia grėsmę ne tik pavieniams vandens organizmams, tačiau ir visai hidroekosistemai (Roy 2010). Metalai, tokie kaip cinkas (Zn), varis (Cu), nikelis (Ni), chromas (Cr), švinas (Pb), kadmis (Cd), dėl jų toksiškumo, persistentiškumo ir bioakumuliacijos, priskiriami prioritetinėms pavojingoms medžiagoms daugelyje pasaulio valstybių (Directive 2008/105/EC; US EPA 2009). Dalis jų yra naudojami kaip vandens kokybės rodikliai (Zn, Cu, Ni, Cr(VI)) (Scorecard 2011). Dėl gebėjimo kaupti įvairius teršalus, žuvis – vienos tinkamiausių taršos indikatorių, naudojamų vertinti vandens ekosistemos būklę (Chovanec et al., 2003). Sunkieji metalai į žuvies organizmą gali patekti dviem keliais: *tiesiogiai* – iš vandens (per žuvies žiaunas bei kūno paviršių) ir *netiesiogiai* – per virškinamąjį traktą (su maistu) (Bury et al., 2003; Arnot and Gobas, 2006). Patekus metalams į organizmą, prasideda bioakumuliacijos procesas – metalai kaupiasi audiniuose, kartu įsijungdami į svarbias baltymų sintezės reakcijas, sutrikdydami gyvybiškai svarbius procesus (Valavanidis et al., 2006).

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama įvairių cheminių medžiagų mišinių (įskaitant ir metalų mišinius) poveikiui žmonių sveikatai ir aplinkai. Europos Parlamentas nuolat atkreipia dėmesį, kad chemines medžiagas reglamentuojančiuose ES teisės aktuose, būtina atsižvelgti į suminį įvairių cheminių medžiagų poveikį (COM (2012) 252 final).

Metalams kaupiantis organizme, tarp metalų mišinyje vyksta sąveikos, kurios būna sinergetinio arba antagonistinio pobūdžio (Cedergreen 2014). Vienų metalų buvimas aplinkoje gali kiekybiškai padidinti arba sumažinti kito metalo kaupimąsi organizme. Galimos sąveikos itin priklauso nuo SM cheminės prigimties, žuvų rūšies, amžiaus, tiriamo organo/audinio, SM mišinio tipo (binarinis, trinaris, daugianaris), koncentracijos, poveikio trukmės, vandens fizikinių-cheminių rodiklių. Metalų sąveika iš esmės gali paveikti

organizme vykstančius svarbius fiziologinius procesus: medžiagų biologinį įsisavinamumą, jų patekimą, pernešimą, metabolizmą ir šalinimą (Cedergreen 2014).

Šiuo metu vis daugiau dėmesio skiriama įvairių mišinių toksiškumui organizmui, nes jie parodo realų poveikio scenarijų gamtoje. Tačiau SM mišiniai, kuriuose SM koncentracijos atitinka realias gamtoje aptinkamas koncentracijas, nėra išsamiai tirti. Daugelyje tyrimų analizuojamas kurio nors vieno ar 2-jų metalų kaupimas ir jų toksinis poveikis žuvims, tačiau gamtinėje aplinkoje žuvis yra veikiamas daugianariais metalų mišiniais, kurie pasižymi aukštesniu toksiškumo laipsniu (Jeziarska and Witeska, 2001). Atlikta tik keletas darbų, kurių metu žuvis buvo eksponuojamos daugianariuose SM mišiniuose esant gamtinei aplinkai artimoms koncentracijoms (Pelgrom et al., 1995; Ribeyre et al., 1995; Komjarova and Blust, 2009a, 2009b). Tokio pobūdžio tyrimai yra gana reti, tyrėjai naudoja skirtingą eksperimentų dizainą, skirtingas akumuliacijos ir toksiškumo organizmams tyrimo metodikas, o gauti rezultatai sunkiai palyginami tarpusavyje ir dažnai atspindi naudojamų eksperimentinių sistemų skirtumus, o ne faktinius rezultatus. Be to, autoriai tyrimus vykdo su viena žuvų rūšimi, naudoja aukštas subletalias ar letalias metalų koncentracijas bei parenka eksperimentiškai nepagrįstą ekspozicijos trukmę (Duran et al., 2015; Driessnack et al., 2016, 2017). Todėl vargu, ar tokio tyrimo rezultatai gali būti ekstrapolijuojami gamtinėms sąlygoms, išskyrus, atsitiktinius avarinius taršos atvejus.

Trūkstant duomenų apie cheminių medžiagų mišinių poveikį organizmams, ES teisėje iki šiol nėra numatyto sistemingo, išsamaus ir integruoto mišinių poveikio vertinimo metodo, kurį naudojant, būtų atsižvelgiama į skirtingus medžiagų patekimo būdus ir mišinio sudedamųjų komponentų savybes (COM (2012) 252 final). Todėl akivaizdu, kad norint išsiaiškinti metalų kaupimosi žuvų audiniuose dėsningumus bei mechanizmus, būtina atlikti kuo daugiau eksperimentinių tyrimų su tokiais mišiniais, kurie sudaryti iš kuo daugiau metalų. Taip pat būtina vykdyti kuo daugiau SM sąveikų tyrimų, su daugianariais metalų mišiniais, kuriuose SM koncentracijos

yra artimos koncentracijoms, galinčioms realiai egzistuoti gamtoje. Taip pat naudoti skirtingas žuvų rūšis bei parinkti žuvų organus/audinius, kurie būtų reikšmingi indikatoriai aplinkos rizikos vertinime (ARV) naudojamų tyrimų rezultatams. Šie tyrimų rezultatai leistų tiksliau nustatyti leistinas ribines vertes konkreitiems metalams vandenyje, atsižvelgiant į kitų metalų buvimą aplinkoje.

Darbo naujumas:

1. Pirmą kartą eksperimentiškai įvertinti SM kaupimosi žuvų audiniuose skirtumai, žuvis veikiant daugianariu SM mišiniu stovinčio ir besisukančio vandens sąlygomis.
2. Pirmą kartą eksperimentiškai nustatyta optimali ekspozicijos trukmė, būtina SM koncentracijos pusiausvyrai audiniuose pasiekti, veikiant žuvis daugianariu metalų mišiniu esant didžiausioms leistinoms SM koncentracijoms (DLK).
3. Eksperimentiškai nustatyta, kad veikiant žuvis daugianariais metalų mišiniais, kuriuose SM koncentracijos atitinka DLK, SM kaupimosi žuvų audiniuose dėsningumai daugeliu atvejų nesutampa su dėsningumais, kurie yra nustatyti žuvis veikiant binariniais SM mišiniais.
4. Pirmą kartą nustatyta, kad 10 kartų sumažinus vieno metalo koncentraciją daugianariame metalų mišinyje, gali reikšmingai pasikeisti kai kurių kitų SM kaupimasis žuvų audiniuose.
5. Nustatyta, kad net ir maitinant vienodu pašaru, *Salmo salar* ir *Perca fluviatilis*, gamtoje mintantys tik gyvūninės kilmės maistu, audiniuose sukaupia daugiau prioritetinių pavojingų metalų (Pb ir Cd) nei *Rutilus rutilus*, kuri gamtoje yra visaėdė. Tačiau būtinieji metalai (Zn, Cu), atvirkščiai, eksperimento metu labiau kaupėsi *R. rutilus* audiniuose. Tai rodo, kad minėtų SM kaupimosi žuvų audiniuose skirtumai nesusiję su mityba ir yra sąlygojami kitų fiziologinių procesų.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad veikiant žuvis daugianariais metalų mišiniais esant gamtinei aplinkai artimoms

SM koncentracijoms, ne visada pasireiškia binariniais metalų mišiniais būdinga sąveika tarp SM. Eksponuojant daugianariuose SM mišiniuose, dažniau stebimas *vienašališkas* metalų kiekio žuvų audiniuose pokytis (sumažėjimas arba padidėjimas). Todėl viso mišinio toksiškumas, kuris tiesiogiai susijęs su metalų sąveika, negali būti prognozuojamas (testuojamas) pagal vieno ar kelių metalų keliamą toksinį poveikį. Mišinį sudarantys komponentai sąveikauja, kiekybiškai padidindami ar sumažindami vienas kito akumuliaciją organizme. Dėl to kartu kinta ir bendras mišinio toksiškumas, kuris gali būti stipresnis arba silpnesnis nei prognozuota.

Nustatyta, kad 10 kartų sumažinus vieno metalo koncentraciją daugianariame metalų mišinyje, suintensyvėja kai kurių kitų metalų kaupimasis žuvų audiniuose. Atitinkamai, konkretaus metalo koncentracijos sumažinimas mišinyje nebūtinai nulemia to metalo reikšmingai mažesnę sukauptą audiniuose, lyginant su sukauptu kiekiu žuvyse, laikytose mišiniuose su sumažinta kurio nors kito SM koncentracija. Tai rodo, kad esant kitiems metalams aplinkoje, nustatytos DLK atskiriems metalams gali būti nesaugios organizmui.

Darbo tikslas – ištirti šešių sunkiųjų metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimosi dėsninumus skirtingų žuvų rūšių audiniuose (žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse), esant didžiausių leistinų koncentracijų neviršijančioms metalų koncentracijoms vandenyje.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimąsi gamtinėje aplinkoje gyvenančių *S. salar*, *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* audiniuose.
2. Palyginti sunkiųjų metalų (SM) kaupimosi dėsninumus *S. salar* audiniuose gamtinėmis ir eksperimentinėmis (stovinčio ir besisukančio vandens) sąlygomis.
3. Eksperimentiškai nustatyti optimalią ekspozicijos trukmę, kurią pasiekus SM koncentracijos *S. salar* audiniuose reikšmingai nebedidėja.

4. Eksperimentiškai nustatyti metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimosi dėsningumus skirtingų žuvų rūšių audiniuose, veikiant skirtingų kombinacijų daugianariais metalų mišiniais.
5. Nustatyti metalotioneinų (MT) koncentraciją skirtingų žuvų rūšių kepenyse ir inkstuose po ekspozicijos daugianariame SM mišinyje.

Ginamieji teiginiai:

1. Veikiant žuvis daugianariu metalų mišiniu besisukančio vandens sąlygomis, SM kaupimosi žuvyse dėsningumai atitinka dėsningumus, nustatytus gamtinėmis sąlygomis. Stovinčio vandens sąlygomis SM kaupimosi dėsningumai pakinta, todėl tokios sistemos netinka eksperimentiniam gamtoje vykstančių procesų tyrimui.
2. Optimalus ekspozicijos laikas, veikiant žuvis daugianariu metalų mišiniu, yra 14 parų.
3. Veikiant žuvis daugianariais metalų mišiniais su sumažinta kurio nors vieno iš metalų koncentracija, SM kaupimosi audiniuose pokyčiai daugeliu atvejų neatitiko SM kaupimosi dėsningumų, nustatytų veikiant binariniais SM mišiniais.
4. Veikiant žuvis SM mišiniais, kuriuose vieno iš metalų DLK yra sumažinta 10 kartų, tam tikrais atvejais, dėl sąveikų vieno iš metalų kaupimasis gali būti didesnis nei eksponuojant mišinyje, kuriame visų SM koncentracijos atitinka DLK.
5. *Salmo salar* ir *P. fluviatilis*, gamtoje mintantys tik gyvūninės kilmės maistu, audiniuose reikšmingai daugiau sukaupia prioritetinių pavojingų metalų (Pb ir Cd) ir mažiau būtinųjų metalų (Zn, Cu) nei *R. rutilus*, kuri gamtoje yra visaėdė. Tačiau šie SM kaupimosi skirtumai nėra priklausomi nuo žuvų dietos, juos turėtų lemti fiziologinių procesų skirtumai skirtingo mitybos tipo žuvyse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Metalų vaidmuo organizme

Metalai – tai cheminiai elementai, kurių atominė masė didesnė nei 40, tankis didesnis nei 5 g/cm^3 bei pasižymi metalinėmis savybėmis. Šiai cheminių elementų grupei priklauso pereinamieji metalai, šarminiai metalai; šarminių žemių metalai; lantanoidai, aktinoidai, pusmetaliai ir kiti metalai (Roy 2010). Metalai gamtiniuose vandenyse gali egzistuoti skirtingomis cheminėmis formomis: joninėje; sudaryti tirpius neorganinius ir organinius junginius; kietųjų dalelių pavidalu, kurios susijungia su molio ar kitomis dirvožemio matricos dalelėmis (Roy 2010).

Gyvuosiuose organizmuose mikroelementai (pvz., Na, K, Ca, Mg) dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų ir organizmui jų reikia nemažais kiekiais. Evoliucijos eigoje tam tikri metalai tapo būtinais arba nebūtinais organizmui. Metalai, kurių stygius organizme gali sukelti gyvybinius funkcijų sutrikimus, priskiriami būtiniesiems mikroelementams (pvz., Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Se ir kt.) (Roy 2010). Metalai laikomi būtiniais, kai (Reilly 2004):

1. nuolat dalyvauja organizmų fiziologiniuose procesuose;
2. esant šių elementų intensyviai naudojimui ar šalinimui iš organizmo, gali būti sutrikdomos gyvybiškai svarbios funkcijos;
3. šių elementų trūkumas kelia fiziologinį ar biocheminį poveikį organizmui.

Pavyzdžiui, Zn dalyvauja daugiau nei 300 fermentų veikloje, yra daugelio baltymų sudėtinė dalis bei kontroliuoja genų ekspresiją (Watanabe et al., 1997), tačiau esant šio elemento pertekliui organizme, jis tampa potencialiai toksišku.

Nebūtinai metalai skirstomi į nebūtinus netoksiškus ir nebūtinus toksiškus metalus. Nebūtinai netoksiški elementai (pvz., Ni, Cr) yra nekenksmingi tol, kol jų kiekis yra žemiau slenkstinės ribos (angl. *threshold level*). Viršijus šią ribą, jie tampa toksiškais ir trikdo gyvybinius procesus. Metalai, kurių biologinis reikšmingumas iki šiol nėra nustatytas ir kurių net minimalios koncentracijos

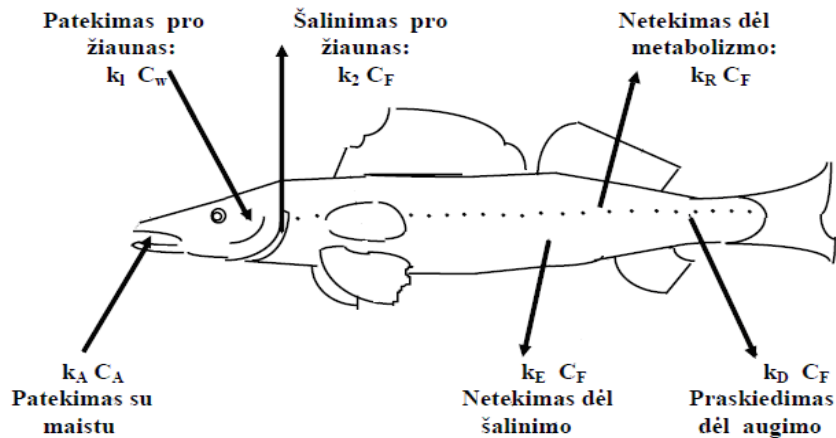
turi toksinį poveikį organizmams, priskiriami nebūtinaiems toksiškiems metalams (pvz., Pb, Cd) (Roy 2010).

Gamtinėje aplinkoje SM sutinkami mišinių pavidalu. Metalams patenkant į organizmą, jie sąveikauja ir turi įtakos kitų metalų patekimo greičiams, kaupimuisi ir toksiškumui (Borgmann et al., 2008).

1.2. Žuvis ekotoksikologiniuose tyrimuose

Vandens tarša yra opi problema visame pasaulyje. Dėl žmogaus veiklos vandens ekosistemos dažnai teršiamos įvairiomis cheminėmis medžiagomis, įskaitant ir SM. Dėl toksinių medžiagų skirtingo biologinio įsisavinamumo, teršalai nevienodu intensyvumu kaupiasi vandens organizmų audiniuose. Todėl būtini išsamūs tyrimai, kurių metu būtų galima įvertinti cheminių medžiagų kaupimosi intensyvumą organizme, leidžiantį prognozuoti teršalų apkrovą aplinkoje (Connell et al., 1999).

Vandens organizmai – puikūs vandens kokybės indikatoriai, kurie padeda nustatyti ir įvertinti teršalų lygį supančioje aplinkoje (dugno sedimentuose, vandenyje). Žuvis pasižymi savybėmis, kurios leidžia jas pasirinkti eksperimentiniu modeliu toksikologiniuose tyrimuose. Jos jautriau reaguoja į supančios aplinkos pokyčius, lyginant su bestuburiais organizmais. Žuvis kaip „kempinė“, kuri linkusi sugerti cheminius teršalus iš vandens, net ir esant mažai šių medžiagų koncentracijai vandenyje (Dhanakumar et al., 2015; Zhao et al., 2015). Teršalų bioakumuliacija – tai ne statinis, o dinaminis procesas, kai teršalų *patekimas* ir *šalinimas* iš organizmo vyksta vienu metu (nusistovi pusiausvyrą). Šį procesą lydi atsirandančios sudėtingos sąveikos tarp metalų patekimo kelių ir šalinimo mechanizmų (ekskrecija, pasyvus išleidimas, metabolizacija) (Streit 1998). Metalai pašalinami iš organų ekskrecijos pagalba (Olsson et al., 1998). Sutrikus šių procesų pusiausvyrai organizme, prasideda toksinių medžiagų bioakumuliacija (1 pav.) (Chahid et al., 2014).



1 pav. Bioakumuliacijos procesas žuvyje (Arnot and Gobas, 2006).

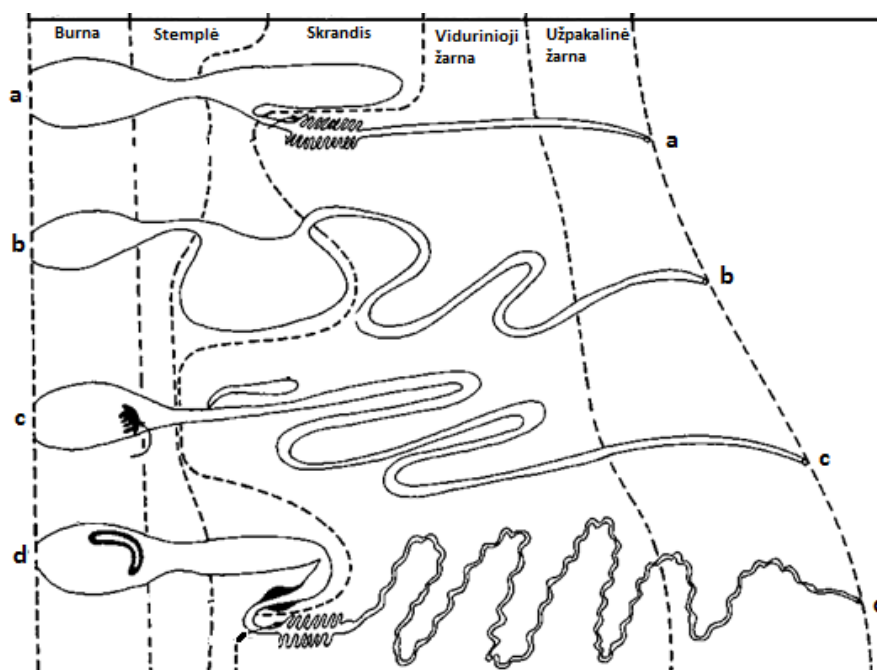
Žuvis turi puikiai išvystytą osmoreguliaciją, endokrininę, nervų ir imuninę sistemą. Jos labai jautrios daugeliui cheminių medžiagų, o taršos lygis gali būti vertinamas skirtingame mitybos lygmenyje, įvairaus dydžio ir amžiaus žuvyse, ko negalima atlikti su bestuburiais organizmais (Burger et al., 2002).

Toksinis teršalų poveikis žuvims vertinamas pagal organizmo biocheminius ir fiziologinius pokyčius. Matuojami žuvų morfometriniai (žuvų ilgis, svoris) bei morfologiniai rodikliai (įmitimo koeficientas (*IK*); visceralinis (*VSI*), žiaunų (*ŽSI*), kepenų (*KSI*), inkstų (*ISI*) somatiniai indeksai). Šiems rodikliams nereikia papildomo duomenų apdorojimo, pakanka pradinių duomenų (žuvies kūno ir organų svorio bei kūno ilgio), kad būtų galima greičiau įvertinti aplinkos ekologinę būklę (Liebel et al., 2013; Sauliutė ir Svecevičius, 2015, 2016).

Atliekant tyrimus laboratorinėmis sąlygomis, žuvų histopatologiniai organų (žiaunų, kepenų) pakitimai taip pat puikus taršos indikatorius. Pasak Hinton ir Lauren (1990), histopatologiniai žuvų organų pakitimai – paprastas, patogus ir dažnas metodas įvertinti tiek trumpalaikį, tiek ilgalaikį toksinės medžiagos poveikį gamtinėje aplinkoje. Taip pat reikia nepamiršti, kad žuvis – svarbus gyvūninių baltymų šaltinis žmogaus organizmui, todėl SM bioakumuliacija žmogaus mitybos grandinėje turi būti nuolat stebima ir kontroliuojama, siekiant įvertinti galimą riziką sveikatai (Metian et al., 2013).

Daugelis lauko ir laboratorinių tyrimų rezultatai įrodė, kad SM kaupimasis žuvų audiniuose priklauso nuo visos eilės abiotinių ir biotinių veiksnių: nuo žuvies rūšies, jos mitybos lygio, maitinimosi įpročių, amžiaus ir dydžio, tarprūšinių jautrumo skirtumų įvairiems metalams, teršalų koncentracijos vandenyje ir nuosėdose, maisto rūšies, vandens fizikinių-cheminių rodiklių bei metalo biologinio įsisavinamumo (Clearwater et al., 2002; Atli and Canli, 2003; Green and Knutzen, 2003; Jezierska and Witeska, 2006; Luczynska and Tonska, 2006; Karthikeyan et al., 2007; Madenjian et al., 2014; Merciai et al., 2014; Yancheva et al., 2014). Nors yra sukaupta nemažai duomenų apie SM bioakumuliaciją žuvų audiniuose iš gamtinių vandens telkinių, tačiau tarprūšiniai žuvų skirtumai, kurie gali turėti įtakos metalo kaupimuisi audiniuose, vis dar ištirti nepakankamai.

Priklausomai nuo žuvų rūšių būdingų maitinimosi įpročių, skiriasi ir žuvų virškinamojo trakto struktūra bei kai kurių organų forma (pvz., kepenų), kuri gali turėti įtakos toksinių medžiagų patekimo greičiams ir pasiskirstymui audiniuose (2 pav.).



2 pav. Skirtingų žuvų rūšių virškinamosios sistemos struktūra: **a** – plėšriųjų žuvų; **b** – visaėdžių (pirmenybę teikiančių gyvūninės kilmės maistui); **c** – visaėdžių (pirmenybę teikiančių augalinės kilmės maistui); **d** – mikrofaginių-planktofaginių žuvų (Fish Feed Technology, 1980).

Plėšrios žuvys linkusios maitintis rečiau ir dideliais kiekiais, todėl šių žuvų skrandis pritaikytas didelio grobio intensyviai virškinimui. Šių žuvų žarnynas yra gana trumpas, todėl maistas, prieš jam patenkant į žarnyną, turi būti gerai apvirškintas skrandžio sulčių, kad žarnynas gebėtų jį pašalinti gana greitai (2a pav.).

Visaėdėms žuvims būdingas itin mažo tūrio skrandis, todėl šios žuvys maitinasi dažnai. Skrandyje maistas ilgai neužsibūna ir keliauja į žarnyną, kuris „apsivijęs“ daugelį vidaus organų (2c pav.). Todėl maistas iš žarnyno pašalinamas lėčiau. Automatiškai ilgėja laikas toksinių medžiagų absorbcijai iš jo. Be to, visaėdžių žuvų kepenys yra netaisyklingos formos (priešingai nei plėšriųjų žuvų). Kepenys „apsivijusios“ žarnyną, todėl manoma, kad kepenims tenka nemažas krūvis detoksikuojant į žarnyną patekusias toksines medžiagas (Fish Feed Technology, 1980).

1.3. Metalų bioakumuliacija

Metalų bioakumuliacija – tai kompleksinis procesas. Metalų jonų patekimas į žuvų organizmą lydima keturių etapų (Campbell 1995):

1. metalo specifiškumas supančioje terpėje nulemia metalo jono difuziją į ląstelės paviršių ir jo adsorbciją ląstelės sienelėje. Metalai tirpale turi būti biologiškai prieinamoje formoje, kad galėtų sąveikauti su ląstelės membrana adsorbcijos/desorbcijos procesų pagalba;
2. adsorbuoto metalo difuzija per ląstelės membraną;
3. sąveika tarp metalo jono ir ląstelės membranos (metalų transportavimas per membraną į citoplazmą (metalų internalizacija));
4. metalų patekimas į organizmo organus/audinius. To rezultatas – metalų saugojimas (biologiškai prieinamo/detoksikuotos formos) ir šalinimas iš organizmo.

Metalų cheminė forma vandenyje priklauso nuo vandens fizikinių-cheminių savybių: pH, vandens kietumo, organinių/neorganinių medžiagų koncentracijos vandenyje (Wood et al., 1997). Metalų jonai – tai viena pagrindinių metalų formų, kuri pernešama per žiaunų membraną. Metalai

vandenyje tampa labiau toksiškesni esant žemam vandens kietumui, žemam pH ir žemai ištirpusių organinių medžiagų koncentracijai vandenyje (Playle et al., 1993a,b). Padidėjus vandens druskingumui, padidėja chloridų susidarymas, kuris sumažina metalų jonų koncentraciją tirpale (Blust et al., 1992).

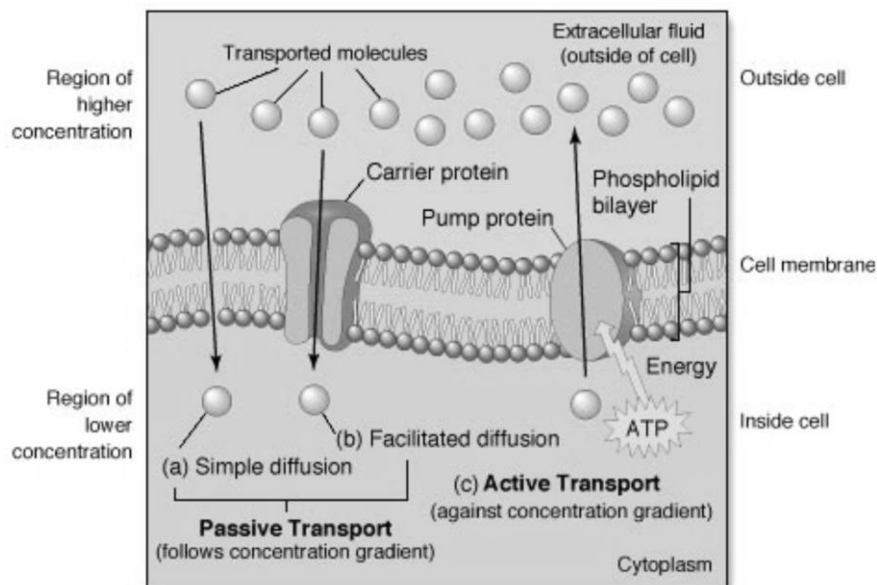
Analizuojant metalų patekimą iš išorinės aplinkos į vandens organizmus difuzijos dėka, turėtų būti atsižvelgiama į organizmo rūšį, metalus ir jų gebėjimą sudaryti kompleksinius junginius vandenyje (Worms et al., 2006). Pasak Hudson (1998), pirmiausia turėtų būti atsižvelgiama į ląstelės paviršiaus plotą. Difuzija – tai metalo patekimo greitį iš tirpalo į ląstelę ribojantis veiksnys. Metalų kompleksiniai junginiai yra nepatvarūs dariniai, kurie bet kada gali disocijuoti į jonus ir vėl sudaryti naujus junginius žiaunų membranoje. Difuzijos metu, jei metalas yra labilus, jis disocijuoja ląstelės paviršiuje ir jo pernešimo greitis tampa priklausomas nuo šio metalo jonų koncentracijos tirpale. Labilūs metalai sudaro junginius su neorganiniais (OH^- , Cl^- , CO_3^{2-}) ir organiniais ligandais. Pavyzdžiui, Fe, Zn, Cu patekimas kontroliuojamas jau difuzijos etape, priklausomai nuo jiems konkurencingų metalų vandenyje ar žiaunų paviršiuje. Nebūtinųjų metalų patekimas iš dalies priklauso nuo būtinųjų metalų, kurie tampa jų pernešėjais (transporteriais) organizme. Plazminės membranos ribotas paviršiaus plotas, gali tapti reikšmingesniu metalų patekimą kontroliuojančiu veiksnium nei jų difuzija iš tirpalo į ląstelę (Worms et al., 2006). Kitas metalo patekimo greitį ribojantis procesas – adsorbcija ląstelės membranoje. Šio proceso metu, metalas gali būti iš karto adsorbuotas ląstelės membranoje be papildomo transportavimo į citoplazmą ar vykstant kitoms cheminėms reakcijoms (pvz., fermentinei/nefermentinei metalų redukcijai) ląstelės paviršiuje (Price and Morel, 1990).

Atsižvelgiant į metalų pernešimo būdą per plazminę membraną, išskiriami šie metalų patekimo keliai (3 pav.):

1. tirpių metalų formų pasyvi difuzija (pvz., alkilinti metalo junginiai, mažai vandenyje tirpūs tirpiniai);

2. pernešimas nešėjų pagalba, tarpininkaujant baltymams ar jonų kanalams. Metalai pernešami pagal koncentracijos gradientą su hidrofilišiais baltymais pasyvios difuzijos pagalba;
3. aktyvioji pernaša jonų kanalais. Pirmiausia, metalų jonai jungiasi su membranos baltymais, po to transportuojami per membraną prieš koncentracijos gradientą. Šiam pernešimui naudojama ląstelės energija;
4. endocitozė – procesas, kurio metu ląstelės išoriniame paviršiuje esantys metalų junginiai apgaubiami ląstelės išorine membrana. Susidariusi membraninė pūslelė patenka į ląstelės vidų.

Daugelis metalų patenka pasyviai pagal koncentracijos gradientą. Šį procesą palengviną baltymai-nešėjai arba kanalai, kurie yra priešingose membranos pusėse. Šie nešėjai perkelia metalų jonus iš didesnės (išorinės ląstelės pusės) į mažesnę koncentraciją (vidinę ląstelės pusę) nenaudojant cheminės energijos (Simkiss and Taylor, 1989). Patekus metalui į ląstelės vidų, jis yra surišamas ligando, kuris yra giminingas tam metalui, dėl šios priežasties, metalas negali kirsti membranos priešinga kryptimi (patekti atgal į išorę). Taigi, metalo koncentracija ląstelės viduje gali būti didesnė nei išorėje ir ją gali dar didinti nuolatinis pasyvus metalų judėjimas iš išorės.



3 pav. Medžiagų judėjimo schema per ląstelės plazminę membraną (General and Human Biology, 2001).

Baltymai-nešėjai perneša konkretų metalo joną ir turi skirtingą giminingumą metalui (Simkiss and Taylor, 1989). Nustatytos trys pagrindinės metalų pernešėjų klasės vandens organizmams (Bury et al., 2003; Worms et al., 2006): P-tipo ATPazė, divalentis metalo nešėjas1 (DMT1, $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$) ir cinko reguliavimo nešėjas/jonų reguliavimo nešėjas (ZRT/IRT). P-tipo ATPazė susijusi su metalų internalizacija ir detoksikacija. DMT1 baltymai papildomai reguliuoja Fe^{2+} ir dalyvauja divalenčių metalų jonų (Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) pernešime. Buvo įrodyta, kad ZRT/IRT baltymai taip pat perneša Cd^{2+} ir Mn^{2+} . Jonų kanalai – tai vandeninės poros, piltuvo formos su įėjimo ir išėjimo angomis lipidų membranoje. Šie kanalai pasižymi aukštu selektyvumu ir yra atsakingi už hidratuotų metalų jonų pernešimą. Pernešamų kanalų selektyvumas taip pat priklauso nuo kanalo krūvio. Pavyzdžiui, katijonų kanalai turi neigiamą krūvį tam, kad pritrauktų teigiamą krūvį turinčius metalų jonus. Atkreiptinas dėmesys į tai, kad dėl mažos kanalų talpos, gali būti pernešami tik metalų jonai, metalų junginiai šiais kanalais nepernešami.

Kitas metalų patekimo kelias iš vandens – aktyvus pernešimas, pasitelkiant į pagalbą joninius siurblius (angl. *ionic pumps*) ar kanalus. Šio proceso metu ląstelė naudoja savo energiją ATP (Adenozin 5' trifosfatą) arba ADP (adenozindifosfatą), kadangi molekulės keliauja prieš koncentracijos gradientą. Pavyzdžiui, Na, K, Ca ir Mg pernešami per hidrofobinę membraną jonų kanalų Na^+/K^+ ATPazės pagalba (Simkiss and Taylor, 1989). Joninių siurblių pernešami SM dažniausiai yra panašaus joninio krūvio ir dydžio. Nors yra manoma, kad kiekvienas metalas turi konkretų patekimo kanalą, tačiau bet kuris metalo jonas gali patekti ir per kitus kanalus, atsižvelgiant į kanalo savybes, hidratuoto ir dehidratuoto jono dydį ir kt. Pavyzdžiui, Ca^{2+} jono dydis yra 0,99 Å, o Cd^{2+} – 0,9 Å, tai leidžia Cd patekti į ląstelę per Ca kanalus (Rainbow 1997). Taip pat buvo nustatyta, kad Mn^{2+} ir Pb^{2+} jonai konkuruoja su kalcio kanalais, o Cu^{2+} ir Ag^+ jonai – su Na^+ kanalais, tačiau nebuvo nustatyta Cu^{2+} jonų įtaka Na^+ jonų kiekio patekimui į ląstelę (Grosell and Wood, 2002).

Patekus metalams į organizmo vidų, tolimesni procesai priklauso nuo organizmo fiziologijos ir metalo specifiškumo. Priklausomai nuo metalo

cheminių savybių, dalis būtinųjų metalų naudojami metaboliniams tikslams. Biomolekulės ar kiti kompleksiniai junginiai gali reguliuoti metalų patekimą, todėl jie dažnai saugomi ląstelių viduje. Po to dalis metalų gali būti transportuojami į organus-taikinius, jungtis į „blogąsias“ biomolekules sukeldami toksinį poveikį. Likusi metalų dalis pašalinami iš organizmo (Rainbow 2002).

Nebūtinieji metalai patekę į ląstelę jungiasi prie fiziologiškai svarbių biomolekulių funkcinių grupių taip išstumdami būtinus metalus iš savo buvimo vietų. To rezultatas – biomolekulių struktūrų ir procesų veiklos pasikeitimai. Siekiant apsaugoti organizmą nuo metalo toksiškumo, viduląstelinė struktūra prisitaikė bioakumuliuoti, reguliuoti ir įmobilizuoti metalus (Mason and Jenkins, 1995). Ši struktūra apima metalus surišančius baltymus (pvz., metalotioneinus), lizosomas, granulės ir membranose susidarancias pūsleles. Būtent nebūtinieji metalai susiję su šiomis ląstelės struktūromis, kurios atsakingos už kenksmingų medžiagų detoksikavimą (Wallace et al., 2003; Wang and Rainbow, 2006). Efektyvus šalinimo mechanizmo išsivystymas rodo organizmo atsaką į ksenobiotikų buvimą organizme (Campbell et al., 2008). Metalų patekimas į organizmą yra gana sudėtingas ir dinaminis procesas, kuris priklauso nuo metalų ir organizmo rūšies bei supančios aplinkos fizikinių-cheminių savybių. Būtent šie veiksniai ir reikalauja išsamaus tyrimo šioje srityje.

1.4. Žuvų audinių specifiškumas metalų kaupimosi procese

Metalų kaupimasis žuvų audiniuose daugelio mokslininkų plačiai tiriama sritis, dėl patogios metalų matavimo procedūros bei dėl galimybės gautus duomenis analizuoti remiantis jau atliktais tyrimų rezultatais. Metalų kaupimosi modelis skiriasi ne tik nuo kitų metalų, tačiau ir nuo audinio, kuriame jis linkęs kauptis (Jeziarska and Witeska, 2001).

Organizmo smegenyse nustatomas mažiausias metalų kiekis, manoma – dėl kraujo-smegenų apsauginio barjero, kuris sulaiko metalų patekimą. Kepenys ir inkstai, priešingai, kaupia daugiausiai metalų, dėl jų atliekamų

pagrindinių funkcijų (detoksikacijos ir klirens) organizme. Ekspozicijos laikas ir veikimo būdas taip pat iš esmės gali pakeisti audinio specifiškumą metalų kaupimosi procese. Taip pat labai priklauso ir nuo kraujo cirkuliacijos greičio organuose. Ilgalaikio poveikio ir apsivalymo metu stebimi kai kurių metalų organų-taikinių svorio pakitimai. Atliktų tyrimų duomenimis nustatyta, kad metalams patenkant per vandenį, žiaunų, kepenų, inkstų bei kaulų svoris linkęs didėti. Susikaupęs didelis metalų kiekis audiniuose gali sukelti tam tikrus audinių patologinius pažeidimus (Jeziarska and Witeska, 2001).

Metalo kaupimasis tiksliniame audinyje priklauso nuo metalų veikimo būdo. Jei žuvis SM bus veikiamos per vandenį, metalai bus linkę kauptis žiaunose, jei per maistą – žarnyne, kepenyse, inkstuose. Į tikslinius audinius metalus išnešioja kraujas. Žuvų žiaunos, kepenys, inkstai ir raumenys – tai pagrindiniai audiniai, geriausiai atspindintys SM kiekius aplinkoje. Būtent todėl šie audiniai dažniausiai naudojami ekologiniuose, toksikologiniuose ir patologiniuose tyrimuose. Pasak Kroglund et al. (2008), žuvų žiaunos tiesiogiai atspindi metalų galimą apkrovą vandenyje, o toksinių medžiagų saugojimą (sankaupas) puikiai indikuoja žuvų kepenys ir inkstai.

Žiaunos – pirminis audinys, reaguojantis į vandens aplinkos pokyčius. Jos sudaro daugiau kaip 50 % išorinio žuvų kūno paviršiaus. Šis daugiafunkcinis audinys dalyvauja jonų transportavime, dujų mainuose, rūgščių-šarmų reguliavime (Dang et al., 2001). Dėl jų struktūros ir atliekamų funkcijų, žiaunos itin jautrios vandenyje esantiems metalams bei vandens fizikinių-cheminių rodiklių pokyčiams – temperatūrai, pH, druskingumui. Žiaunos – tai biotinis ligandas, gebantis surišti metalų jonus. Metalų jonai šiame audinyje linkę bioakumuliuotis, dėl žiaunų neigiamo krūvio (Teien et al., 2006; Playle 2004). Rosseland et al. (2007) teigia, kad žiaunos yra tas organas, kuriame galima įvertinti būtinųjų (Cu, Zn, Se, Fe) ir nebūtinųjų (Al, As, Cd, Cr, Ni, Pb) metalų sukeltą toksinį poveikį, veikiant tiesiogiai ar netiesiogiai, didelėmis, subletalinėmis ar mažomis šių metalų koncentracijomis. Žiaunų morfologiniai pokyčiai puikiai indikuoja supančios aplinkos toksinį poveikį žuvis (Georgieva et al., 2014).

Kepenys ir inkstai. Metalams patekus per žuvų žiaunas ir kirtus biologinius barjerus, SM išnešiojami į organus, kuriuose vyksta metaboliniai procesai (kepenys ir inkstai). Kepenys – tai detoksikacijos organas, kuris svarbus tiek metabolizme, tiek toksinių medžiagų išskyrimui iš organizmo (Hinton and Lauren, 1990; Nunes et al., 2015). Be to kepenyse, vyksta intensyvi kraujo cirkuliacija, kuri taip pat turi įtakos metalų kiekio padidėjimui šiame audinyje. Karadede et al. (2004) nustatė, kad kepenyse metalai detoksikuojami ar kaupiami, po to jie patenka į inkstus. Kaulinių žuvų inkstai kartu su žiaunomis ir žarnynu yra atsakingi už skysčių šalinimą ir homeostazės palaikymą organizme (Ojeda et al., 2003). Be to, šis organas gamina šlapimą, su kuriuo iš organizmo pašalinami ksenobiotikai. Intensyviau nei kituose audiniuose, kepenyse ir inkstuose yra linkę kauptis Zn, Cu, Pb, Cd, greičiausiai dėl šiuos metalus surišančių baltymų – metalotioneinų (MT), kurie sintetinami šiuose organuose (Atli and Canli, 2003; Ploetz et al., 2007). Patekę į ląstelę, SM jonai skatina MT sintezę. Metalotioneinai – citoplazminiai, mažos molekulinės masės (6000 – 7000 Da) monomeriniai baltymai, sudaryti iš globulinių domenų, kurių kiekvienas sudaro metalo merkpto domeną. Šie baltymai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, suriša metalų jonus ir dalyvauja SM detoksikacijos procese (Vasak 2005). MT suriša Cd, Hg, Ag, Zn, Cu, bet labiausiai – Zn, Cu ir Cd (Haq et al., 2003).

Raumuo – žuvies kūno dalis, kuri labiausiai vertinama ir rekomenduojama žmogaus mityboje. Raumenys sudaro daugiau kaip 50 % žuvies kūno svorio, todėl būtų galima manyti, kad didžiausia metalų apkrova tenka raumenims. Lyginant su kitais audiniais, gamtinių ir eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad žuvų raumenyse metalų akumuliacija yra mažiausia. Nepaisant to, raumuo yra įtrauktas į daugelio šalių stebėjimo ir rizikos vertinimo programas, kadangi vartojamas maistui (Guérin et al., 2011; Merciai et al., 2014).

1.5. Vandens hidrocheminių rodiklių įtaką metalų biologiniam įsisavinamumui

Metalų gebėjimas sukelti toksinį poveikį vandens organizmams priklauso nuo vandens fizikinių-cheminių rodiklių, kurie turi įtakos metalų biologiniam įsisavinamumui. Metalo biologinis įsisavinamumas priklauso nuo koncentracijos, metalo gebėjimo sudaryti junginius su organiniais ar neorganiniais ligandais bei nuo metalo specifiškumo (Playle 1998; Niyogi and Wood, 2004; Paquin et al., 2002). Kiti veiksniai – vandens kietumas, pH, kitų SM jonų koncentracija, temperatūra, deguonies koncentracija, ištirpusios organinės medžiagos taip pat turi įtakos SM biologiniam įsisavinamumui (Grosell et al., 2006). Esant aukštai Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} koncentracijai vandenyje, SM toksinis poveikis mažėja, dėl antagonistinės sąveikos su metalų jonais žiaunų membranoje.

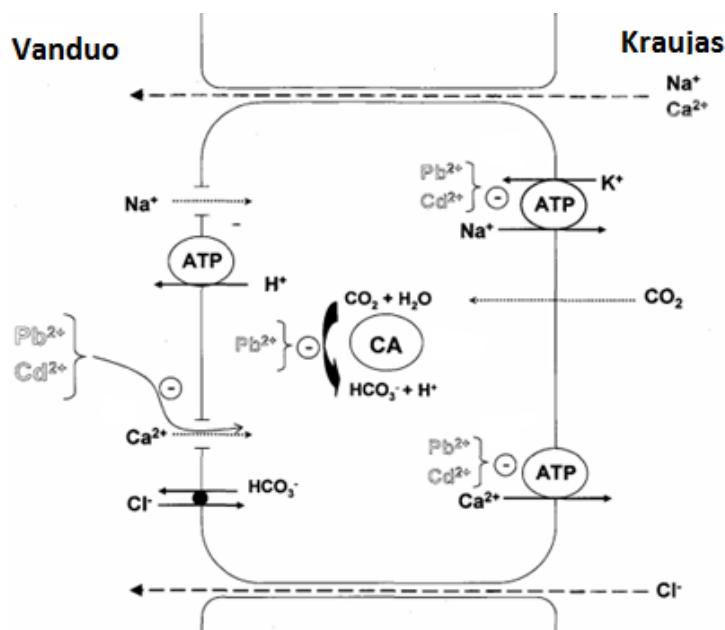
Hidratuoti jonai ir hidroksi- junginiai – tai metalų forma, kuri lengvai patenka per žuvų žiaunas (Erickson et al., 1996). Švino, Cu, Hg specifiškumą itin veikia vandens pH pokyčiai, o Zn ir Cd yra šiek tiek jautrūs pH pokyčiams. Kalcio jonų koncentracija vandenyje, turi didelės įtakos metalų absorbcijai per žiaunų membraną. Atsiranda antagonistinė sąveika tarp divalenčių metalų ir kalcio jonų žiaunų membranoje, jiems patenkant per jonų kanalus. Esant aukštam vandens kietumui, sumažėja SM patekimas (Wicklund and Runn, 1988; Köck et al., 1995). Metalų patekimas per žiaunų membraną vyksta nuolatos, dėl vandens tekėjimo per žiaunas. Kylant vandens temperatūrai, suintensyvėja deguonies eikvojimas ir medžiagų apykaita, lygiagrečiai greitėja ir žiaunų ventiliacija. To pasekmė – suintensyvėja toksinių medžiagų patekimas ir jų akumuliacija žuvų organizme (Chovanec et al., 2003).

Vandens kietumas – vandens rodiklis, kuris ypatingai svarbus, norint prognozuoti metalų toksinį poveikį minkštame ir rūgščiame (pH 5,5 – 6,5) vandenyje. Rūgščiuose ir minkštuose vandenyse, žuvų užterštumas metalais yra aukštesnis, nes bendra metalų (tirpių ir netirpių) koncentracija, jų biologinis įsisavinamumas yra didesnis, lyginant su kietesniu vandeniu, kurio pH artimas neutraliam (pH = 7) (Campbell and Stokes, 1985). Minkštame

vandenyje metalų toksiškumas didėja dėl didesnio elektrocheminio gradiento, kuris padidina Ca^{2+} jonų nuostolius žiaunose. Difuzijos metu, divalenčių metalų jonų (pvz., Ca^{2+}) nuostoliai žiaunose yra atvirkščiai proporcingi išorinei Ca^{2+} koncentracijai vandenyje. Todėl dėl Ca^{2+} homeostazės palaikymo organizme, būtinas intensyvesnis Ca^{2+} patekimas į žuvies organizmą (Evans et al., 2005). Tačiau šis procesas kartu padidina ir konkurencingų SM jonų patekimą per žiaunų membraną.

Žuvis nuolat patiria Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} jonų nuostolius žiaunose, dėl kraujo vandens elektrocheminio gradiento bei dėl jų pašalinimo su šlapimu. Šie nuostoliai glaudžiai susiję su SM jonų patekimu per žiaunas. Šiame procese dalyvauja specializuotos MRC ląstelės (angl. *mitochondria rich cells*), turinčios daug mitochondrijų, platų kanalų tinklą bei apikalius mikrogaurelius, kurie padidina paviršiaus plotą jonų patekimui. Esant dideliame mitochondrijų kiekiui, MRC ląstelėse gaminama ATP, kuri būtina aktyviam jonų pernešimui žiaunose (Wilson and Laurent, 2002). Manoma, kad MRC ląstelės pirmiausia padeda Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} patekimui ir šių elementų aktyviam pernešimui. Na^+ patekimo apikalinis kanalas yra susijęs su H^+ išstūmimu per protonų siurblius (H^+ -ATPazės), kurie kartu su Na^+/K^+ ATPaze sukuria elektrocheminį gradientą judant Na^+ (4 pav.). Panašiai patenka ir Ca^{2+} jonai aktyvaus pernešimo metu per apikalius Ca^{2+} kanalus. Ca^{2+} jonai juda pagal koncentracijos gradientą, kurį sukuria Ca^{2+} -ATPazė (Shahsavarani et al., 2006). Chloridų patekimas palengvina apikalinio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mainus (Wilson and Laurent, 2002). Kadangi žiaunų apikalinė MRC ląstelių membrana nuolatos veikiama vandens srauto ventiliacijos, ji tampa SM organu-taikiniu.

Dėl panašaus jonų valentingumo, daugelis metalų sutrikdo Na^+ ir Ca^{2+} jonų koncentracijos pusiausvyrą žiaunose. Todėl, manoma, kad divalenčiai metalai (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} ir kt.) sutrikdo Ca^{2+} patekimą žiaunose. Kalcio pusiausvyros sutrikdymas gali būti žalingas organizmui. Kalcis yra kaulinio audinio sudedamoji dalis, palengvina raumeninio audinio susitraukimą bei dalyvauja kaip pernešėjas tarpląsteliniuose ir viduląsteliniuose cheminiuose procesuose stuburiniuose organizmuose.



4 pav. Metalų patekimo mechanizmas (Wood 1992; Marshall 2002).

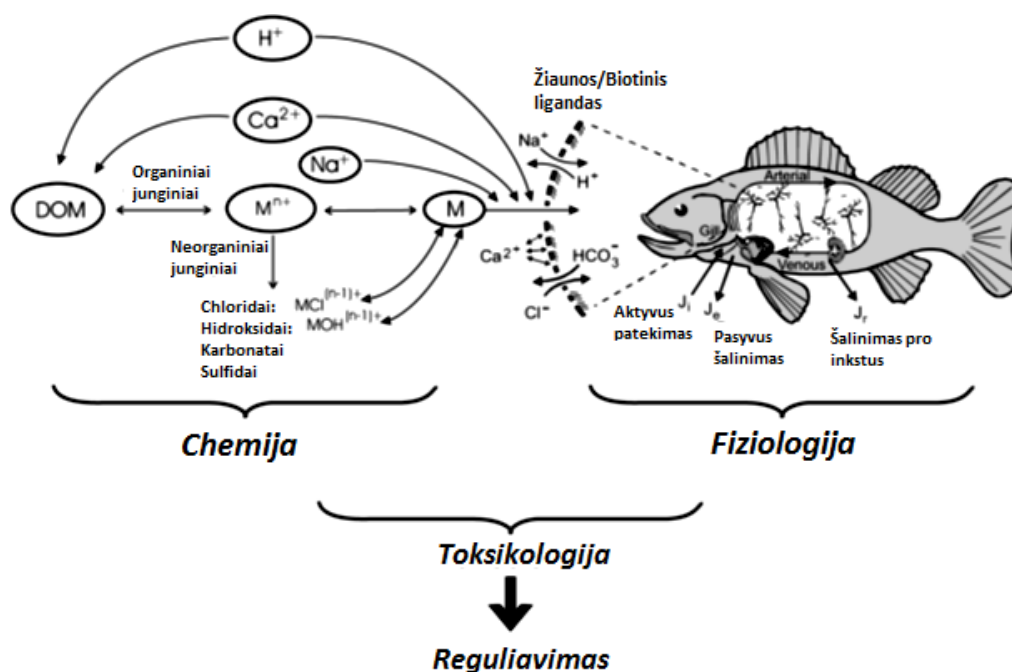
Natris tai pat itin svarbus organizmui, padedantis palaikyti osmosinį balansą tarpląsteliniam skystyje, taip pat atsakingas už nervinių ląstelių depoliarizaciją. Pavyzdžiui, metalams Cu^+ ir Ag^+ patekus per žiaunų Na^+ kanalus, vyksta sąveika tarp Na^+/K^+ -ATPazės, kurio metu sutrikdomas Na^+ jonų patekimas į organizmą (Pelgrom et al., 1995; Schjolden et al., 2007). Atlikti tyrimai rodo, kad Pb^{2+} taip pat gali sukelti Na^+ ir Cl^- pusiausvyros sutrikimus, nepaisant to, kad jonai yra skirtingo valentingumo (Rogers et al., 2003, 2005).

Metalų toksiškumas anksčiau buvo siejamas tik su organizmo kvėpavimo sutrikimu, tačiau atlikti tyrimai patvirtino, kad atsiranda antagonistinė sąveika tarp SM ir Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} jonų vandenyje, kuri slopina šių elementų pernešimą per žuvų žiaunų membraną (Paquin et al., 2002).

1.6. Žuvų žiaunos kaip biotinis ligandas

Gėlavandenių žuvų žiaunos – tai daugiafunkcinis organas, kuris dalyvauja ne tik dujų mainų procese, tačiau ir azoto šalinime, rūgščių-šarmų, jonų pusiausvyros reguliavime organizme (Wilson and Laurent, 2002; Evans et al., 2005).

Biotinis ligando modelis (BLM) (angl. *Biotic Ligand Model*) – vienas pagrindinių modelių, kuris paremtas žuvų žiaunų pagrindine savybe – absorbuoti metalų jonus savo paviršiumi (angl. *gill-binding*). BLM padeda nustatyti ryšį tarp metalo koncentracijos vandenyje ir jo galimo toksinio poveikio organizmui bei prognozuoti metalo biologinį įsisavinamumą, atsižvelgiant į vandens fizikinius-cheminius rodiklius (Paquin et al., 2002) (5 pav.).



5 pav. Biotinis ligando modelis (BLM), apimantis cheminius ir fiziologinius procesus bei jų sąveiką (Paquin et al., 2002).

BLM naudojamas ekologiniame rizikos vertinime (ERA), kuriant vandens kokybės kriterijus metalams. Vandens kokybės gairės metalams dažnai yra paremtos vandens kietumu, kuris padeda įvertinti atskiro metalo toksiškumą, tačiau negali nustatyti metalo mišinio interaktyvaus poveikio žuvims (Norwood et al., 2003; Niyogi and Wood, 2004; Playle 2004). Iki šiol Jungtinėse Valstijose aplinkos apsaugos agentūroje BLM pagrindu buvo parengtas ir patvirtintas vandens kokybės kriterijus Cu, Pb ir Cd (US EPA 2009). BLM sukurtas žiauninių metalų (angl. *metal-gill*) stabilumo konstantų pagrindu, kurios prognozuoja metalų ir jų junginių koncentraciją vandenyje, konkurenciją tarp panašų krūvį turinčių SM jonų bei metalų absorbciją vandens

organizmų žiaunų membranoje (Playle et al., 1993b; Paquin et al., 2002). Biotinis ligandas yra vieta, kurioje lengvai absorbuojami metalai, ir kurių toksiškumas organizmui tiesiogiai proporcingas absorbuotam metalų kiekiui žiaunose (Playle 2004).

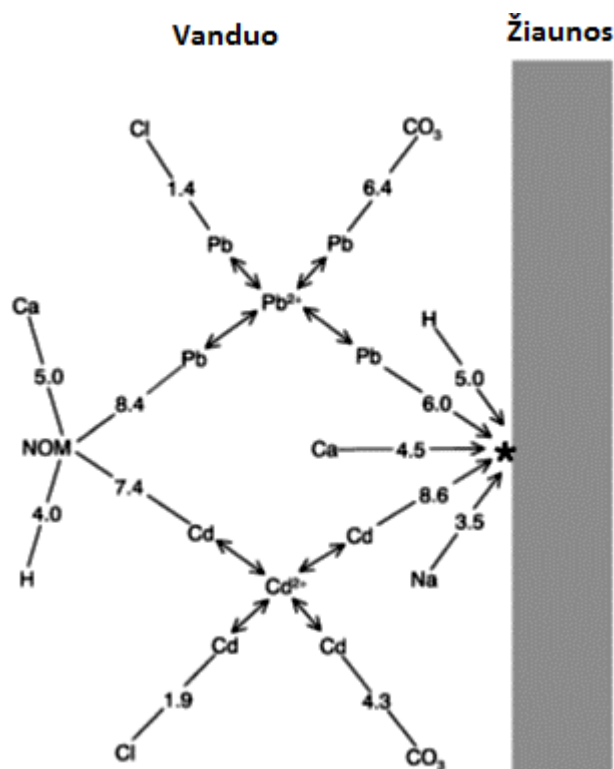
BLM sudarytas iš dviejų submodelių: pirmasis – tai cheminės medžiagos pusiausvyros submodelis, kuris prognozuoja metalo akumuliacijos lygį veikimo vietoje (biotiniame ligande), atsižvelgiant į vandens rodiklius; antrasis – tai toksiškumo submodelis, pagal kurį apskaičiuojamas metalo akumuliacijos lygis, būtinas toksikologinio atsako prognozavimui (Paquin et al., 2002).

Skirtingos SM koncentracijos vandenyje ne visada sukels tokį patį ar panašų toksinį poveikį žuvis. Taip yra dėl to, kad kiekvienas metalas turi tam tikrą sąlyginį surišimo koeficientą žiaunose, kuris parodo konkretaus metalo afiniškumą ligandui (pvz., Ca^{2+} kanalui žiaunose). Metalo surišimo koeficientas gali atvaizduoti metalo santykinį toksiškumą lyginant su kitais metalais (Playle 2004). Pavyzdžiui, Cd aukštesnė surišimo koeficiento vertė ($\text{LogK}_{\text{Cd-gill}} = 7,3$; Hollis et al., 2000) parodo Cd sukeliama didesnę toksiškumą organizmui, lyginant su Pb koeficiento verte ($\text{LogK}_{\text{Pb-gill}} = 7,05$; Birceanu et al., 2008) (6 pav.) (Playle 2004).

Todėl manoma, kad BLM gali nustatyti metalo afinitetą tam tikram ligandui bei jo toksiškumo laipsnį. BLM yra paremtas prielaida, kad metalo sukiamas toksinis poveikis bei jo surišimas žiaunose, priklauso nuo jo jono krūvio. Tačiau, metalo jono biologinis įsisavinamumas labai priklauso ir nuo vandens fizikinių-cheminių rodiklių. SM joninė forma sudaro junginius su organinėmis ir neorganinėmis medžiagomis, kurios yra biologiškai mažiau įsisavinamos žiaunų membranoje, todėl automatiškai sumažėja SM toksiškumas (Niyogi and Wood, 2004).

Niyogi et al. (2015) analizavo metalų (Cd, Zn, Cu, Ag, Ni) interaktyvų poveikį vaivorykštinių upėtakių jaunikliams. Žuvis veikė 3 val. skirtingų kombinacijų metalų binariniais mišiniais. Analizavo Ca^{2+} ir Na^+ jonų patekimo intensyvumą į žuvies organizmą. Tyrėjai išskėlė hipotezę, kad binariniai mišiniai, sudaryti iš metalų, turinčių vienodą patekimo kelią ir toksiškumą

(pvz., Cd ir Zn – Ca^{2+} antagonistai; Cu ir Ag – Na^+ antagonistai), turi sumažinti vienas kito absorbciją žiaunose ir sukelti antagonistinę sąveiką tarp būtinųjų jonų.



6 pav. Švino ir Cd surišimo modelis žiaunose. Vaizduoja konkurencingas SM jonų jungimosi vietas biotiniame ligande ir metalo trauką ligandui (koeficientas $\text{Log}K$) (Playle 2004).

Be to, metalai, kurie turi skirtingus patekimo kelius (pvz., Cd ir Cu; Cd ir Ni), neturi įtakos vienas kito patekimui ir Na^+ , Ca^{2+} transportui per žiaunų membraną. Tyrimų rezultatai parodė, kad tiek Zn, tiek Cu sumažina Cd surišimą žiaunose, tačiau Ni neturi įtakos Cd absorbcijai. Nustebino Ag, kuris skatino Cu kaupimąsi žiaunose esant aukštai jų koncentracijai, tačiau Cu neturėjo poveikio Ag absorbcijai. Esant Cd ir Zn mišinyje, buvo stebimas tarpusavio slopinimo poveikis žiaunose, tačiau padidėjo Ca^{2+} patekimas, lyginant su Cd ir Zn veikimu atskirai. Panašus tarpusavio slopinimo poveikis buvo stebimas, veikiant žuvis Cu ir Ag mišiniu. Na^+ patekimas buvo reikšmingai didesnis, nei veikiant Cu ir Ag atskirai. Tyrėjai patvirtino, kad gauti rezultatai patvirtino iškeltas hipotezes. Gauti tyrimo rezultatai turi svarbią reikšmę ateityje, norint įvertinti metalų mišinio toksiškumą žuvis. Tačiau

ateityje dėmesys turėtų būti skiriamas BLM kūrimui *daugianariams* metalų mišiniams, kad gautus eksperimentinio tyrimo rezultatus būtų galima ekstrapoliuoti gamtinėms sąlygoms (Niyogi and Wood, 2003, 2004).

1.7. Metalo patekimo-bioakumuliacijos-šalinimo mechanizmas žuvų organizme

1.7.1 Cinkas

Cinkas (Zn) – būtinas elementas organizmo augimui, dauginimuisi, vystymuisi, regėjimo ir imuninės sistemos funkcijų palaikymui (Watanabe et al., 1997). Zn tampa toksišku, padidėjus jo koncentracijai vandenyje. Atsiranda antagonistinio pobūdžio sąveika tarp Zn^{2+} ir Ca^{2+} jonų žiaunų membranoje, kurios pasekmė – hipokalcemija.

Patekimas. Zn į žuvies organizmą patenka per žiaunas ir žarnyną. Absorbuoto Zn kiekis priklauso nuo žuvų fiziologinės būklės, vandens rodiklių, Zn koncentracijos vandenyje ir biologinio įsisavinamumo. Cinko patekimo keliai į žuvų organizmą yra glaudžiai tarpusavyje susiję. Manoma, kad Zn absorbcija iš žarnyno yra dominuojantis patekimo kelias tiriant žuvis gamtinėje aplinkoje. Sumažėjus Zn kiekiui maiste, žiaunos tampa svarbiu audiniu, ypač kai Zn koncentracija vandenyje yra padidėjusi. Daugelis tyrimų įrodė, kad vandens kietumas tiesiogiai koreliuoja su Zn toksiškumu, nes Zn^{2+} ir Ca^{2+} jonai konkuruoja tarpusavyje jiems patenkant per žiaunų membraną. Daugelis tyrimų įrodė, kad Ca slopina Zn akumuliaciją žiaunose arba atvirkščiai. Niyogi ir Wood (2006) tyrė vaivorykštinius upėtakius, kurie buvo maitinami gausiai Ca praturtintu maistu. Pastebėta, kad po kurio laiko, Ca ir Zn patekimas per žiaunas sulėtėjo. Panašius tyrimo rezultatus gavo ir Hogstrand et al. (1996b) atlikę Ca intraperitoninę injekciją žuvis, kurio metu sumažėjo Ca^{2+} ir Zn^{2+} absorbcija iš vandens.

Bioakumuliacija. Esant mažai Zn koncentracijai aplinkoje, Zn labiau linkęs koncentruotis gonadose, dėl aktyvios metabolinės veiklos jose. Esant aukštai Zn koncentracijai vandenyje, Zn akumuliacija suintensyvėja žiaunose,

dėl didelio žiaunų paviršiaus ploto ir tiesioginio kontakto su išorine aplinka. Cinkui patenkant iš maisto, stebimas padidėjęs Zn lygis virškinimo trakte, kepenyse ir inkstuose (Jeziarska and Witeska, 2006). Atliktų tyrimų duomenimis nustatyta, kad Zn mažiausiai linkęs kauptis raumenyse, dėl žemo lygio metalus surišančių baltymų (MT) šiame audinyje (Allen-Gill and Martynov, 1995).

Šalinimas. Cinko pašalinimas iš žiaunų, kepenų, inkstų vyksta sparčiai, tačiau šio elemento pašalinimas iš viso kūno vyksta gana lėtai – eliminacijos pusperiodis virš 200 parų (Wicklund Glynn 1991). Šiai dienai menkai žinomas Zn pašalinimo mechanizmas iš žuvų organizmo. Hardy et al. (1987) nuosekliai tyręs Zn ekskreciją iš vaivorykštinio upėtakio organizmo nustatė, kad žiaunos gana glaudžiai susijusios su šio elemento šalinimu.

Sąveika. Zn žuvų audiniuose ypatingai sąveikauja su Ca, Cu ir Cd. Cinkas ir Cd – chemiškai panašūs elementai, turi stiprią jungtį su sulfidriolo grupėmis. Pirmenybė jungtis prie šios grupės teikiama Zn, tačiau dėl itin didelio elementų panašumo, Cd dažnai pakeičia Zn baltymų struktūroje. Todėl esant Zn jonų trūkumui organizme, tiesiogiai didėja Cd toksiškumas. Sąveika tarp Zn ir Ca vyksta, dėl Zn gebėjimo kirsti žiaunų membraną per Ca^{2+} kanalus. Ca^{2+} slopinimas vyksta dėl bendrų Ca^{2+}/Zn^{2+} surišimo vietų žiaunose. Žiaunos 10 kartų labiau linkusios absorbuoti Zn^{2+} nei Ca^{2+} (Hogstrand et al., 1996b). Vaivorykštinio upėtakio organizme Zn ir Cu taip pat slopina vienas kito patekimą (Ojo et al., 2009). Tai susiję su šių metalų baltymais-nešėjais, kurie konkuruoja tarpusavyje žiaunų membranoje. Pastebėta, kad iš visų esančių katijonų, Cu^{2+} stipriausiai slopina Zn^{2+} patekimą (Qiu and Hogstrand, 2005).

1.7.2 Varis

Varis (Cu) – būtinas elementas, kuris veikia kaip daugelio baltymų kofaktorius ir vaidina svarbų vaidmenį ląstelių kvėpavimo procese. Padidėjus Cu kiekiui ląstelėse, dėl Cu oksidacijos-redukcijos savybių, suintensyvėja laisvųjų radikalų gamyba ir kaupimasis audiniuose. Be to, sukelia virškinimo fermentų slopinimą žarnyne bei sumažina žarnyno judrumą (Woodward et al.

1995). Esant padidėjusiai Cu^{2+} koncentracijai vandenyje, sumažėja Na^+ jonų absorbciją žiaunose. To rezultatas – osmoreguliacijos sutrikdymas. Organizmas reguliuoja kraujyje cirkuliuojantį Cu kiekį, stengdamasis išlaikyti pusiausvyrą tarp Cu patekimo ir ekskrecijos (Grosell and Wood, 2002).

Patekimas. Maistas – pagrindinis Cu šaltinis vandens organizmui. Žiaunos turi įtakos Cu absorbcijai iš aplinkos (Taylor et al., 2000). Miller et al. (1993) ir Kamunde et al. (2002a) naudodami Cu radionuklidus (^{64}Cu) įvertino Cu patekimą iš maisto ir vandens. Tyrimo metu nustatyta, kad Cu patekimas iš vandens buvo reikšmingai didesnis, esant Cu trūkimui maiste. Niyogi and Wood (2003) taip pat nurodė, kad SM patekimas iš maisto gali turėti įtakos metalų patekimui iš vandens. Metalų patekimas iš maisto yra reguliuojamas virškinamojo trakto, sukuriant stiprų apsauginį barjerą, kuris efektyviai reguliuoja metalų įsisavinamumą. Tuo tarpu žiaunos tampa svarbios, kai reikia palaikyti vario homeostazę organizme. Cu akumuliacijos lygis žiaunose priklauso nuo konkurencingų katijonų (Na^+ , Ca^{2+} ir H^+), organinių medžiagų, karbonatų (CO_3^{2-}), hidroksidų (OH^-) koncentracijos vandenyje, kurie sumažina Cu biologinį įsisavinamumą (Niyogi and Wood, 2003).

Bioakumuliacija. Kepenys – pagrindinis organas, reguliuojantis Cu metabolizmą (Kamunde et al., 2001, 2002a). Variui patenkant su maistu, kraujo pagalba jis patenka į kepenis. Šiame organe intensyviai sintetinamas baltymas ceruloplazminas, kuris reguliuoja Cu pernešimą (Harris 1991). Kalcis taip pat gali būti pernešami baltymo albumino ir kitų mažos molekulinės masės baltymų. Ceruloplazmino pagalba, Cu gabenamas į ekstrahepatinius audinius, kur saugomas Cu-baltymų kompleksuose arba pašalinamas per tulžį (Cousins 1985). Cu intensyviausiai akumuliuojasi kepenyse, dėl efektyvaus plazminio Cu klirensu kepenyse. Kita kaupimosi priežastis – aukšta Cu-baltymų nešėjų ekspresija.

Šalinimas. Vario perteklius pašalinamas per tulžį (Grosell et al., 2012). Manoma, kad žuvų žiaunos taip pat dalyvauja Cu šalinimo procese, tačiau tai dar nėra įrodyta. Variui patenkant iš vandens, skatinama Cu ekskrecija per tulžį (Grosell et al., 2001).

Sąveika. Cu žuvų audiniuose itin sąveikauja su Cd ir Ag. Ilgalaikio poveikio tyrime nustatyta, kad subletalinė Cu koncentracija padidino Cd kaupimąsi ilgėjant ekspozicijos laikui (McGeer et al., 2007). Grosell et al. (2002) nustatė antagonistinę sąveiką tarp Cu ir Ag, jiems patenkant per žiaunų membraną per apikalinius Na⁺ kanalus bei stiprų Na⁺/K⁺-ATPazės slopinimą. Tačiau Nadella et al. (2007) ištyrė, kad Ag skatina Cu kaupimąsi vaivorykštinių upėtakių žarnyne ir žiaunose.

1.7.3 Nikelis

Žinoma, kad nikelis (Ni) yra svarbi maistinė medžiaga tiek augalams, tiek sausumos gyvūnams, tačiau šio elemento biologinis svarbumas žuvims dar nėra įrodytas (Chowdhury et al., 2008). Gėlo vandens telkiniuose Ni jonai 99,9 % jungiasi su organiniais kompleksais (Xue et al., 2001) sudarydami ligandus, kurie padidina Ni mobilumą organizme. Ni organinių kompleksų labilumas priklauso nuo vandens pH, organinių, neorganinių junginių bei katijonų (Ca²⁺, Mg²⁺) koncentracijos vandenyje. Ni žuvų organizme sukelia kvėpavimo sutrikimus, sukeldamas žiaunų arterinio kraujo deguonies/anglies dioksido apykaitos sutrikimus bei kvėpavimo takų acidozę (Pane et al., 2003). Taip pat Ni sukelia inkstų kanalėlių pakitimus bei slopina Mg reabsorbciją (Pyle and Couture, 2012). Dėl Ni sukeliama oksidacinio pažeidimo, atsiranda ląsteliniai pakitimai.

Patekimas. Chowdhury et al. (2008) tyrė Ni homeostazės reguliavimą vaivorykštinių upėtakių organizme. Netirpi Ni forma gali būti pernešama fagocitozės ar pernešėjų pagalba. Esant mažai Ni koncentracijai vandenyje, žiaunos vaidina svarbų vaidmenį Ni homeostazės palaikyme, tačiau padidėjus Ni koncentracijai, įsijungia kiti organai (pvz., inkstai), kurie padeda reguliuoti Ni patekimo srautus organizme (Brix et al., 2004). Taip pat esant aukštai Ni koncentracijai vandenyje, stebimas suintensyvėjęs Ni kaupimasis kraujo plazmoje, kuris indukuoja Ni patekimą per žiaunų membraną (Chowdhury et al., 2008). Nikelio patekimą per žiaunas palengvina lipofiliniai Ni organiniai

junginiai, kurie dažnai sutinkami užterštuose vandens telkiniuose (Brix et al., 2004).

Bioakumuliacija. Ni kaupimosi mechanizmas audinyje tiesiogiai susijęs su jo koncentracija kraujyje (Pane et al., 2004a,b). Kraujyje cirkuliuojantis Ni, 90 % jungiasi su albuminu, likusi dalis – su amino rūgštimis (cisteinu ir histidinu) arba peptidais. Kraujo plazma reguliuoja Ni transportavimą į tikslinius audinius. Nikeliui patenkant iš vandens, jis linkęs kauptis žuvų kauluose, žvynuose ir inkstuose (Ptashynski and Klaverkamp, 2002). Tyrimo duomenimis nustatyta, kad Ni pirmiausia linkęs kauptis žuvų inkstuose (Ptashynski and Klaverkamp, 2002; Pane et al., 2004a,b; Chowdhury et al., 2008). Šis kaupimosi dėsnigumas indukuoja kitą homeostazės reguliavimo mechanizmą, kurio metu vyksta Ni pertekliaus šalinimas iš organizmo. Vaivorykštiniai upėtakiai ilgalaikio poveikio metu buvo veikiami Ni per vandenį. Tyrimų rezultatai parodė galimą Ni sekreciją ir reabsorbciją iš žuvų inkstų (Pane et al., 2005, 2006a,c). Tai įrodo Ni homeostazės kontrolę, kurią reguliuoja žuvų inkstų sistema.

Šalinimas. Žuvų žiaunos nėra pagrindinis audinys Ni šalinimo procese. Vaivorykštinių upėtakių žiaunose Ni kiekis didėjo, didinant Ni koncentraciją vandenyje (Pane et al., 2004b). Be to, kai žuvis buvo infuzuojamos Ni, tik mažas Ni kiekis buvo pašalintas per žiaunų membraną. Pane et al. (2004b) teigimu, žuvų virškinamasis traktas vaidina svarbesnį vaidmenį Ni šalinimo procese. Ni labiausiai kaupiasi inkstuose. Šis organas pasižymi efektyvia Ni reabsorbcija, todėl inkstai nėra svarbūs Ni šalinimo procese. Priešingai, jūrinėse žuvyse inkstai vaidina svarbų vaidmenį Ni ekskrecijoje (Pane et al., 2006b).

Sąveika. Daugelio tyrėju nustatyta, kad Ni yra Mg antagonistas. Sąveika tarp Ni-Mg buvo tiriama bakterijose, grybuose, paukščiuose ir žinduoliuose, tačiau neseniai pradėta tirti ir žuvyse (Pane et al., 2005, 2006c). Manoma, kad Ni²⁺ veikia kaip Mg²⁺ analogas ir dalyvauja kaip Mg²⁺ transporteris fiziologiniuose procesuose. Nikelis taip pat trikdo Fe²⁺ ir Fe³⁺ absorbciją žuvų žarnyne (Kwong and Niyogi, 2009). Ni yra stipriausias Fe slopintojas

vaivorykštinių upėtakių žarnyne, lyginant su kitais metalais (Pb, Cd, Cu, Zn, Co). Taip pat Ni gali trukdyti metalo fermentų funkcionavimui bei konkuruoti su kofaktoriais, tokiais kaip Ca, Fe, Mg, Mn ir Zn (Kasprzak, 1987).

1.7.4 Chromas

Chromas (Cr) plačiai naudojamas pramonėje ir yra vienas pagrindinių vandens teršalų (Moore 1991). Priklausomai nuo vandens hidrologinių savybių, Cr egzistuoja dviejų formų: trivalentis (Cr(III)) arba šešiavalentis (Cr(VI)) (Moore 1991). Esant deguonies prisotintame vandenyje, dominuoja Cr(VI) tirpi forma (Eisler 1986). Šio elemento biologinis įsisavinamumas priklauso nuo jo formos tirpumo ir vandens pH. Cr(III) tirpumas yra labai mažas, lyginant su Cr(VI) (Gendusa and Beitinger, 1992). Todėl Cr(VI) į žuvų audinius intensyviau patenka iš vandens nei per maistą. Priklausomai nuo vandens pH, Cr(VI) vandenyje gali egzistuoti kaip sudėtiniai anijono komponentai: chromatas (CrO_4^{2-}), hydrochromatas (HCrO_4^{1-}) arba dichromatas ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). Šios joninės formos pasižymi aukštu tirpumu bei mobilumu vandenyje. Cr(VI) anijono junginiai gali stipriai oksiduoti organines medžiagas, kurių metu Cr(VI) virsta Cr(III) jonu. Vandens fizikiniai-cheminiai parametrai keičia Cr(VI) toksiinį poveikį žuvims. Sumažėjus vandens pH ir vandens kietumui, didėja žuvų mirtingumas, veikiant Cr(VI) (US EPA 1985).

Lyginant su kitais SM, Cr nėra itin toksiškas. Jis priskiriamas prie mikroelementų, tačiau nėra jokių duomenų apie jo homeostazės reguliavimą organizme. Šis elementas – gliukozės tolerancijos faktorius, dalyvauja angliavandenių ir riebalų metabolizme. Chromo trūkumas organizme sukelia gliukozės tolerancijos sumažėjimą. Cr(VI) įtrauktas į vandens kokybės rodiklių sąrašą (Scorecard 2011) ir rekomenduojama jį naudoti kaip etaloninę toksiinę medžiagą standartiniuose toksiškumo testuose (US EPA 2009). Per pastaruosius dešimtmečius intensyviai buvo tiriamas šio elemento toksiškumas vandens organizmams, kurio metu buvo surinkta ir išanalizuota nemažai duomenų (Eisler 1986; Irwin et al., 1997). Irwin et al. (1997) teigia, kad Cr(VI) – tai stiprus oksidatorius, gebantis lengvai prasiskverbti pro biologinę

membraną sukeldamas ląstelės pažeidimus. Ūmi Cr(VI) koncentracija sukelia morfologinius žuvų žiaunų, inkstų ir skrandžio pakitimus, taip pat hematokrito koncentracijos pokyčius kraujyje (Van der Putte et al., 1981a). Moksliniai tyrimai parodė, kad Cr(VI) sukelia hepatotoksiškumą ir kancerogeniškumą žuvims (Svecevičius 2006).

Patekimas. Chromo(VI) patekimas į organizmą yra susijęs su difuzijos gradientu – pasyviu Cr(VI) pernešimu per žuvų žiaunas. Fromm ir Stokes (1962) patvirtino šią išvadą, įrodydami, kad Cr kiekis upėtakių organizme proporcingas poveikio koncentracijai. Van der Putte et al. (1981a) atsižvelgdamas į žiauninių plokštelių epitelio pažeidimus nustatė, kad žiaunos yra Cr tikslinis organas jam patenkant iš vandens.

Bioakumuliacija. Nustatyta, kad Cr nėra kaupiamas kraujo eritrocituose. Šis elementas transportuojamas į kraujo plazmą iš kurios patenka į tikslinius audinius. Chromas labiausiai linkęs kauptis žiaunose, kepenyse (Svecevičius, 2007b; Palaniappan and Karthikeyan, 2009), inkstuose (Palaniappan and Karthikeyan, 2009) ir kituose audiniuose, įskaitant ir raumenis, kuriuose nustatomas minimalus Cr kiekis (Ghosh and Adhikari, 2006; Palaniappan and Karthikeyan, 2009).

Šalinimas. Cr(VI) akumuliacija ir ekskrecija žiaunose priklauso nuo vandens pH. Kuo žemesnis vandens pH, tuo Cr patekimas ir šalinimas vyksta intensyviau. Cr šalinimas vyksta, dėl pasyvaus jo išskyrimo per žiaunas. Van der Putte (1981b) tyrė Cr ekskreciją per inkstus. Po 25 parų eliminacijos periodo, Cr kiekis inkstuose sumažėjo 50 %, lyginant su kepenimis, skrandžiu, žarnynu. Taip pat nustatyta, kad pašalintas Cr kiekis iš žarnyno, tiesiogiai proporcingas Cr koncentracijai kraujyje (Van der Putte et al., 1981b).

Sąveika. Ghosh ir Adhikari (2006) nustatė antagonistinę sąveiką tarp Cr(VI) ir Ca²⁺ jonų. Tai gali būti susiję su šių elementų vienudu patekimo keliu per Ca²⁺ kanalus. Adhikari et al. (2006) tyrimo metu nustatė, kad Cr kaupimasis žuvų (*L. rohita*) audiniuose atvirkščiai proporcingas vandens pH/bendram šarmingumui. Gauti rezultatai buvo pagrįsti ne antagonistine

sąveika tarp H^+/Ca^{2+} ir Cr(VI), o sumažėjusiu Cr(VI) biologiniu įsisavinamumu (Cr iškritimu į nuosėdas) esant aukštesniam vandens pH.

1.7.5 Švinas

Švinas (Pb) – persistentinis teršalas, kurio biologinė funkcija žuvims nėra žinoma (Ribeiro et al., 2014). Pagrindinis Pb sukeliamas toksinis poveikis ilgalaikio poveikio metu – hematologinių parametrų pokyčiai (Hodson et al., 1978), nervų ir inkstų sistemų sutrikimai (Patel et al., 2006). Ūminio poveikio metu, Pb patenkant iš vandens, sukeliama K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} jonų reguliavimo sutrikimai, o lėtinio veikimo metu, sukeliama uodeginio peleko ir stuburo iškrypimai bei hemoglobino sintezės sutrikdymas (Rogers et al., 2005). Švinas tampa toksišku net ir esant mažai jo koncentracijai vandenyje. Pb priskiriamas nebūtinaiems toksiškiems metalams, kurie pasižymi disfunkciniu poveikiu – būtinųjų metalų (Ca^{2+} ir Zn^{2+}) pakeitimu. Esant ūmiam švino toksiškumui, prie itin aukštų koncentracijų, sutrikdoma žuvų kvėpavimo sistema. Dėl Pb ir Ca konkurencingo patekimo per Ca^{2+} kanalus žiaunų membranoje, slopinamas Ca^{2+} jonų patekimas, to pasekoje išsivysto hipokalcemija (Rogers et al., 2003; Rogers and Wood, 2004).

Patekimas. Pb į žuvies organizmą gali patekti per žiaunas, odą ir žarnyną. Gėlavandenių ir jūrinių žuvų žiaunose Ca^{2+} jonų transportavimas vyksta per žiaunų membraną pasyviu būdu Ca^{2+} –ATPazė ir / arba Na^+/Ca^{2+} jonų kanalais (Marshall 2002). Daugelis autorių analizavo sąveiką tarp Ca ir Pb žuvų žiaunose, veikiant žuvis tiek per vandenį, tiek per maistą. Nustatė, kad Pb linkęs slopinti Ca patekimą į žuvų organizmą ir atvirkščiai. Taip pat autoriai nustatė, kad didėjant Ca^{2+} koncentracijai vandenyje, mažėja Pb toksiškumas (Rogers and Wood, 2004). Švino patekimas per odą – tai mažiausiai tikėtinas procesas, kadangi manoma, kad oda yra apsauginis barjeras, paprastai nelaidus nelipofiliniams metalams. Nepaisant to, atliktuose tyrimuose, vis dėlto nustatomas minimalus Pb kiekis žuvų odoje ar raumenyse. Tam įtakos gali turėti Pb patekimo mechanizmų panašumas per odą ir žiaunas. Didžiausias mitochondrijų tankis (kuriose išsidėstę Ca^{2+} kanalai) dažnai nustatomas odoje,

ties žiaunų žandikauliu ir *Operculum*. Pažymėtina, kad Ca^{2+} patekimas koreliuoja su mitochondrijų skaičiumi odoje (Marshall et al., 1992). Taigi, jei iš tiesų Pb patenka iš aplinkos per odą, tam įtakos greičiausiai gali turėti Ca^{2+} koncentracija supančioje aplinkoje.

Bioakumuliacija. Pb patekus į kraujotaką, 99 % jo sparčiai jungiasi su kraujo eritrocitais (Manton and Cook, 1984) ir išnešiojamas į tikslinius audinius. Švino randama žuvų kauluose, žiaunose, inkstuose, žarnyne, raumenyse, kepenyse, blužnyje. Intensyviausiai Pb linkęs kauptis žiaunose ir inkstuose. Kadangi Pb yra laikomas Ca^{2+} analogu, didelė Pb dalis linkusi kauptis kalciniuose kietuosiuose audiniuose – griaučiuose, žvynuose. Nemažas Pb kiekis randamas žuvų blužnyje. Tai gali būti susiję su eritrocitų sulaikymu, gamyba ir šalinimu. Ekspozicijos pradžioje Pb akumuliacija būna intensyvi, po to gali stabilizuotis, sulėtėti arba palaipsniui didėti ilgėjant ekspozicijos trukmei. Grosell et al. (2006) analizavo Pb kaupimąsi ir *P. promelas* audiniuose 30 parų ekspozicijos laike. Rezultatai parodė intensyvią Pb kaupimąsi žuvų žiaunose ir žarnyne, o Pb kaupimasis kauluose palaipsniui didėjo, ilgėjant ekspozicijos trukmei.

Šalinimas. Analizuojant Pb akumuliaciją per mitybą, nustatyta, kad žiaunos vaidina svarbų vaidmenį Pb šalinime, tačiau tyrėjai negalėjo paaiškinti ekskrecijos mechanizmo (Alves and Wood, 2006). Varanasi ir Markey (1978) atliko tyrimą, kurio metu *O. kisutch* buvo injekuota švino nitratu (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Nustatyta žema, tačiau reikšminga Pb koncentracija (4,4 $\mu\text{g}/\text{l}$) epidermio gleivėse. Galima daryti prielaidą, kad Pb šalinimo mechanizmas per žiaunų ir odos gleivinę gali būti panašus, tačiau žiaunų vaidmuo šalinimo procese iki šiol nėra įrodytas. Švino ekskreciją per žuvų inkstus susijusi su aktyvios reabsorbcijos slopinimu proksimaliniuose kanalėliuose. Pb į inkstus atkeliauja kompleksinės formos (pvz., susijungęs su baltymu albuminu ar GSH), tik maža dalis Pb yra joninės formos. Švino reabsorbcija kanalėliuose gali vykti endocitozės būdu ar $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aktyvaus transporto keliu. Ca^{2+} ekskrecija iš vaivorykštinių upėtakių tulžies taip pat netiesiogiai parodo, kad šalinimas per tulžį taip pat gali būti svarbiu Pb eliminacijos iš žuvų organizmo keliu

(Bucking and Wood, 2007). Žarnyno epitelio gleivinė geba intensyviai surišti toksines medžiagas. Gleivinės atsinaujinimas (angl. *sloughing*) atlieka apsauginę funkciją nuo Pb absorbcijos žarnyne. Atsižvelgiant į tai, Pb greičiausiai išskiriamas į tulžį arba į žarnyną (Ojo and Wood, 2007). Bucking ir Wood (2007) rezultatai parodė, kad išskiriami nedideli Ca^{2+} kiekiai vaivorykštinių upėtakių vidurinės ir užpakalinės žarnos dalyje virškinimo metu. Atsižvelgiant į tai, kad Pb ir Ca^{2+} patekimo keliai yra tie patys, galima daryti prielaidą, kad per žarnyną gali būti pašalinamas ir minimalus Pb kiekis, tačiau reikėtų atsižvelgti į veikimo būdą (per vandenį ar per mitybą), norint įvertinti organo reikšmingumą Pb šalinimo procese.

Sąveika. Komjarova ir Blust (2009a) nustatė, kad daugeliu atvejų Pb kaupimasis žiaunose ir visame kūne tiesiogiai didėjo, didinant kitų metalų koncentracijas mišinyje. Išskyrus Cu, kur Pb kaupimasis pradžioje didėjo, po to sumažėjo. Ankstesnių tyrimų rezultatai teigia, kad tarp Pb ir Cu egzistuoja sinergetinė sąveika. Veikiant *P. innesi* Pb ir Cu mišiniu, nustatyta, kad šie metalai palengvino vienas kito kaupimąsi (Tao et al., 1999). Birceanu et al. (2008) nustatė, kad Pb + Cd mišinys sinergistiškai slopina Ca^{2+} ir Na^+ patekimą. To rezultatas – sukeliama hipokalcemija ir hiponatremija. Taip pat keliuose darbuose buvo analizuojama sąveika tarp Zn ir Pb. Nustatyta, kad ilgalaikio poveikio metu, didinant Pb koncentraciją tirpale, mažėja Zn koncentracija organizme. Tai galėjo lemti antagonistinę sąveiką tarp šių metalų (Schmitt et al., 2005).

1.7.6 Kadmis

Kadmis (Cd) – vienas labiausiai toksiškų metalų. Pasižymi persistentiškumu ir gebėjimu kauptis gyvųjų organizmo audiniuose. Tai nebūtinai toksiškas metalas, kurio biologinė reikšmė nėra žinoma. Vandens organizmai Cd lengviausiai pasisavina iš vandens, jam esant joninėje formoje (Perera et al., 2015). Aplinkoje Cd^{2+} gali sudaryti toksiškus junginius, kurie pasižymi aukštesniu stabilumo laipsniu (Wepener et al., 2001). Kadmio toksinis poveikis pasireiškia žuvų inkstų ir kaulų sistemų sutrikdymu. Vandens

kietumas – vienas pagrindinių veiksnių, turintis įtakos žuvų fiziologinei būklei ir Cd toksiškumui (Saglam et al., 2013). Padidėjęs Ca^{2+} kiekis maiste, apsaugo žuvis nuo galimo Cd^{2+} patekimo iš vandens ir maisto (Baldisserotto et al., 2005). Kadmio mobilumas ir biologinis įsisavinamumas sustiprėja, esant žemam vandens pH, kietumui, žemai suspenduotų medžiagų koncentracijai, žemam vandens druskingumui ir aukštam oksidacijos-redukcijos potencialui (Irwin et al., 1997).

Patekimas. Tyrimų duomenimis nustatyta, kad Cd^{2+} absorbcijos konstanta ($\log K$) žuvų žiaunose yra daug aukštesne nei žarnyne (Klinck et al., 2007). Todėl per pastarąjį laikotarpį, Cd^{2+} patekimas per žiaunas yra plačiai analizuojamas. Kadmio yra laikomas Ca^{2+} analogu (Playle et al., 1993a; Hollis et al., 2000; Niyogi and Wood, 2004; Niyogi et al., 2008). Nustatyta, kad Cd^{2+} slopina Zn^{2+} patekimą, dėl vienodo patekimo kelio per Ca^{2+} kanalus žiaunų membranoje (Wicklund-Glynn 2001). Cd^{2+} jonai yra absorbuojami pasyvios difuzijos arba transportuojami pernešėjų per žiaunas. Cd patekęs per žiaunas ar žarnyną, yra išnešiojamas baltymų-nešėjų į tikslinius audinius (Olsson et al., 1998). Patekus Cd į ląstelę, vyksta sąveika su fermentais, kurie sukelia MT sintezę (Thompson and Bannigan, 2008). Cd surišamas su albuminu ir transportuojamas į kepenis. Kepenyse Cd surišamas MT ir po to pernešamas į kraujo plazmą, iš kurios patenka į inkstus. Šiame etape, lizosomos suskaldo MT-Cd junginį ir Cd^{2+} jonai pašalinami su šlapimu (Annabi et al., 2011). Buvo atlikti trumpalaikiai tyrimai su vaivorykštiniais upėtakiais, kurių metu buvo tiriama sąveika tarp Cd^{2+} ir Ca^{2+} žiaunų epitelyje (Niyogi and Wood, 2004; Niyogi et al., 2008). Šis tyrimas atskleidė Cd^{2+} dvi skirtingas jungimosi vietas žiaunose. Pirmoji yra susijusi su aukšto afiniteto, žemo pajėgumo jungimosi vietomis, kai Cd koncentracija vandenyje yra sąlyginai maža ($\leq 20 \mu\text{g/l}$), o Ca^{2+} -ATPazė vaidina svarbų vaidmenį, išlaikant Ca^{2+} homeostazę žuvies organizme. Antroji yra susijusi su žemo afiniteto ir aukšto pajėgumo jungimosi vietomis, kai Cd koncentracija vandenyje yra aukšta ($\geq 20 \mu\text{g/l}$). Tada Ca jonų koncentracija vandenyje turi mažiau įtakos Cd patekimui per žiaunas (Birceanu et al., 2008; Niyogi et al., 2008).

Bioakumuliacija. Cd iš kraujo plazmos absorbuojamos į tikslinius vidaus organus. Aukščiausias Cd kiekis nustatomas žuvų kepenyse ir inkstuose. Chowdhury et al. (2003, 2004) nustatė, kad Cd kiekis kepenyse didėja intensyviau nei inkstuose, nors žuvų inkstai yra atsakingi už Cd kaupimą ir saugojimą. Tai gali būti susiję su Cd pernešimu iš kepenų į inkstus saugojimo etapui. Thomann et al. (1997) sukūrė farmokokinetinį modelį, kuris buvo paremtas Cd poveikiu vaivorykštiniam upėtakiams per maistą ir vandenį, žuvis eksponuojant 350 paras. Nustatė, kad Cd kaupimosi pusiausvyra (angl. *steady-state*) visame kūne buvo pasiekta apytiksliai po 50 parų o inkstuose Cd koncentracijos pusiausvyra nebuvo pasiekta. Taip pat nustatė, kad Cd kiekis inkstuose didėjo, nors žuvis ir nebuvo veikiamos Cd (apsivalymo fazė). Tai gali būti susiję su Cd mobilizacija iš tikslinio organo (pvz., kepenų) į inkstus ilgalaikiam šio metalo saugojimui. Gėlavandenės žuvis, priklausomai nuo poveikio būdo, Cd linkusios kaupti inkstuose, žiaunose, kepenyse ir žarnyne, mažiau – kraujyje, raumenyse ir smegenyse. Veikiant žuvis per vandenį, Cd kaupiasi šia seka: inkstai > žiaunos > kepenys > žarnynas; per maistą: žarnynas > inkstai > kepenys > žiaunos (Chowdhury et al., 2005).

Šalinimas. Cd biologinis eliminacijos pusperiodis stuburiniuose gyvūnuose yra gana ilgas, nes jie neturi efektyvaus Cd pašalinimo mechanizmo. Cd patenkant iš maisto, žuvų virškinimo traktas yra Cd absorbcijos barjeras. Didelė dalis Cd pašalinama kartu su išmatomis per gleivinės atsinaujinimą (angl. *sloughing*). Chowdhury et al. (2004) įrodė, kad tik maža dalis (2 – 6 %) infuzuoto Cd į skrandį, buvo internalizuota žarnyne. Nedidelė Cd dalis taip pat gali būti šalinama per žiaunas, su tulžimi ir šlapimu. Didelė dalis Cd yra saugoma inkstuose (Chowdhury et al., 2004). Veikiant žuvis Cd per maistą, padidėja Cd išskyrimo greitis su šlapimu (Chowdhury and Wood, 2007). Panašūs rezultatai gaunami žuvis veikiant per maistą/vandenį ilgalaikio poveikio metu, kur reikšmingai padidėja Cd hepatobiliarinė ekskrecija (Chowdhury et al., 2003, 2004). Taip pat nedidelė Cd dalis pašalinama per žiaunas, matyt dėl gleivinės atsinaujinimo (Handy 1996).

Sąveika. Cd sąveikauja su mažiausiai trimis metaboliniais metalais (Ca, Zn, Fe) bei turi didelį afinitetą (didesnį už Zn) prisijungti prie –SH grupių, todėl dažnai jis pakeičia Zn, kuris yra daugelio fermentų sudėtinė dalis. Vandens organizmuose Cd sąveikauja su Ca^{2+} žiaunų paviršiuje, šį procesą lydi ūminė hipokalcemija ir galiausiai mirtis (Verbost et al., 1989). Keliuose darbuose buvo analizuojamos sąveikos tarp Cd-Pb ir Cd-Cu žuvyse. Birceanu et al. (2008) nustatė antagonistinę sąveiką tarp Cd ir Pb žiaunose, kurios metu Cd slopina Pb kaupimąsi. Tai galėjo lemti tarp šių metalų atsiradusi konkurencija, jiems patenkant per Ca^{2+} kanalus žiaunose (Rogers and Wood, 2004; Rogers et al., 2005). Be to šiems metalams būnant mišinyje (Pb + Cd), buvo stebimi Ca^{2+} ir Na^{+} pusiausvyros sutrikimai žiaunose. Pelgrom et al. (1994) veikė žuvis Cd + Cu mišiniu per vandenį ir nustatė, kad sukauptas Cd kiekis visame kūne buvo mažesnis, lyginant su atskiru Cd veikimu. Tačiau autorius nenustatė jokio pastovaus Cu poveikio Cd kaupimuisi, žuvis veikiant Cd + Cu mišiniu. Tai rodo, jog metalo mišinio poveikio mechanizmas, įtraukiantis metalų sąveikas ir akumuliaciją poveikio metu, negali būti prognozuojamas pagal atskiro metalo sukeltą toksinį poveikį.

1.8. Metalų reglamentavimas

1.8.1 Reglamentuojamos SM normos Lietuvos paviršiniuose vandens telkiniuose

Paviršinių vandenų cheminės būklės vertinimo kriterijai yra Nuotekų tvarkymo reglamento, patvirtinto Lietuvos Respublikos aplinkos ministro 2006 m. gegužės 17 d. įsakymu Nr. D1-236 (Žin., 2006, Nr. 59-2103; 2010, Nr. 59-2938, 2011, Nr. 39-1888), „Dėl nuotekų tvarkymo reglamento patvirtinimo“, 2010 m. pateikta redakcija, į kurią perkeltos Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2008/105/EB nuostatos. Reglamento 1 priede ir 2 priedo A, B dalyse nurodytos medžiagų (įskaitant ir SM) aplinkos kokybės standartai paviršiniuose vandenyse, DLK vandens telkinyje-priimtuve (1 lentelė, 2 lentelė). Papildomi paviršinių vandenų cheminės būklės vertinimo kriterijai yra

„Nuotekų tvarkymo reglamento“ (pakeisto Lietuvos Respublikos aplinkos ministro 2014 m. rugsėjo 15 d. įsakymu Nr. D1-236) 1 priede ir 2 priedo A dalyje nurodytų medžiagų aplinkos kokybės standartai paviršiniuose vandenyse, atitinkantys Direktyvos 2013/39/ES II priede nustatytus aplinkos kokybės standartus.

1 lentelė. A dalis. Prioritetinių SM DLK vidaus paviršiniuose vandenyse ir aplinkos kokybės standartai (AKS).

Medžiagos pavadinimas	CAS Nr.	Pagal Nuotekų tvarkymo reglamento 2010 m. redakciją			Pagal Nuotekų tvarkymo reglamento 2014 m. redakciją		
		MV-AKS Vidaus paviršiniai vandenys	DLK – AKS Vidaus paviršiniai vandenys	AKS biota	MV-AKS Vidaus paviršiniai vandenys	DLK – AKS Vidaus paviršiniai vandenys	AKS biota
		µg/l		µg/kg	µg/l		µg/kg
Kadmis ir jo junginiai (priklausomai nuo vandens kietumo klasės)	7440-43-9	≤ 0,08 (1 klasė) 0,08 (2 klasė) 0,09 (3 klasė) 0,15 (4 klasė) 0,25 (5 klasė)	≤ 0,45 (1 klasė) 0,45 (2 klasė) 0,6 (3 klasė) 0,9 (4 klasė) 1,5 (5 klasė)		≤ 0,08 (1 klasė) 0,08 (2 klasė) 0,09 (3 klasė) 0,15 (4 klasė) 0,25 (5 klasė)	≤ 0,45 (1 klasė) 0,45 (2 klasė) 0,6 (3 klasė) 0,9 (4 klasė) 1,5 (5 klasė)	
Švinas ir jo junginiai	7439-92-1	7,2	Netaikoma		1,2	14	
Gyvsidabris ir jo junginiai	7439-97-6	0,05	0,07	20		0,07	20
Nikelis ir jo junginiai	7440-02-0	20	Netaikoma		4	34	

2 lentelė. B dalis. Kitų Lietuvoje kontroliuojamų SM DLK vidaus paviršiniuose vandenyse pagal nuotekų tvarkymo reglamentą.

Medžiagos pavadinimas	CAS Nr.	DLK ⁰ į nuotekų surinkimo sistemą	DLK ⁰ į gamtinę aplinką	DLK ⁰ vandens telkinyje-priimtuve	Ribinė koncentracija ¹ , į nuotekų surinkimo sistemą	Ribinė koncentracija ¹ , į gamtinę aplinką
mg/l						
Chromas-bendras	7440-47-3	2	0,5	0,01	0,4	0,1
Varis	7440-50-8	2	0,5	0,01	0,4	0,1
Cinkas	7440-66-6	3	0,4	0,1	0,6	0,16

⁰Šis parametras yra DLK, išreikštas kaip metinė vidutinė vertė

¹Ribinė koncentracija – ribinė didžiausia apskaičiuota, išmatuota arba planuojama medžiagos koncentracija, iki kurios šios medžiagos normuoti/kontroliuoti dar nereikia

Direktyvoje pateikti peržiūrėti kriterijai šioms medžiagoms: antraceniui, bromintiems difenileteriams, fluorantenui, švinui ir jo junginiams, naftalenui, nikeliui ir jo junginiams, poliaromatiniams angliavandeniliams (1 lentelė). Peržiūrėtieji kriterijai turi būti taikomi nuo 2015 m. gruodžio 22 d., ir kad ne vėliau kaip 2021 m. gruodžio 22 d. tų medžiagų atžvilgiu būtų pasiekta gera

paviršinių vandens telkinių cheminė būklė. Reglamento 1 priede ir 2 priedo B dalyje pateikiamos kitų Lietuvoje kontroliuojamų SM DLK vidaus paviršiniuose vandenyse pagal nuotekų tvarkymo reglamentą (2 lentelė).

Neužterštuose gėluose vandenyse Zn koncentracija dažniausiai kinta nuo 1,96 iki 3,92 µg/l (Voets et al., 2006), o užterštuose vandens telkiniuose nuo 130,8 iki 2222,9 µg/l (Bervoets and Blust, 2003). Vario koncentracija gamtiniuose vandenyse svyruoja nuo 0,508 iki 5,08 µg/l (Kamunde et al., 2002a), o užterštose teritorijose gali viršyti 19,1 µg/l (Bervoets and Blust, 2003). Nikelio koncentracija gamtiniuose vandenyse svyruoja nuo 0,587 iki 9,98 µg/l, o užterštuose vandenyse gali siekti iki 146,7 µg/l (Giguere et al., 2005). Chromo koncentracija gėluose neužterštuose vandens telkiniuose gali svyruoti nuo 0,1 iki 6,0 µg/l, o užterštuose telkiniuose gali siekti iki 84,0 µg/l (Bowen 1979). Švino koncentracija gėluose vandenyse kinta nuo 0,124 iki 0,228 µg/l (Fischer et al., 2001), o užterštose teritorijose nuo 10,4 iki 82,9 µg/l (Grosell et al., 2006). Neužterštuose vandenyse Cd koncentracija gali svyruoti nuo 0,034 iki 1,12 µg/l, tačiau dėl žmogaus antropogeninės taršos, Cd koncentracija vandenyje gali viršyti 22,5 µg/l (Bervoets and Blust, 2003).

Pagal 2010–2013 m. Aplinkos apsaugos agentūros (AAA) vykdyto Valstybinio paviršinių vandens telkinių (upių, ežerų) monitoringo duomenis, pavojingų medžiagų koncentracijos buvo tirtos tik Kauno mariose ir 19-oje upių 26-iose monitoringo vietose. Tirtuose vandens telkiniuose nebuvo viršytos SM DLK, išskyrus 2012 m. Hg koncentraciją Skirvytėje ties Rusne.

1.8.2 Reglamentuojamos SM normos žuvininkystės produktuose

Didžiausi leistini SM kiekiai (mg/kg) žuvininkystės produktuose yra nustatyti 2006 m. gruodžio 19 d. Komisijos reglamentu (EB) Nr. 1881/2006, nustatančiu didžiausias leistinas tam tikrų teršalų maisto produktuose koncentracijas. Žuvininkystės produktams reglamentuotos Pb, Cd, Hg normos. Atsižvelgiant į žuvų rūšis, didžiausia leistina *švino* koncentracija žuvų raumenų mėsoje yra **0,30** mg/kg drėgno produkto svorio, *kadmio* **0,05 – 0,10** mg/kg drėgno produkto svorio, (Durklažuvių (*X. gladius*) raumenų mėsoje – 0,30

mg/kg drėgno produkto svorio), *gyvsidabrio* **0,50 – 1,0** mg/kg drėgno produkto svorio. Reglamente taip pat nurodoma, kad intensyviausiai metalus kaupia prie dugno gyvenančios (giliavandenės) bei riebiosios jūrinės žuvis, o taip pat plėšriosios žuvis: kardžuvės, rykliai, tunai, buriažuvės, ešeržuvės, Europinės lydekos, ežeriniai upėtakiai. Minėtos žuvis kaupia didesnius Hg kiekius nei kitos žuvų rūšys. Toksinės medžiagos linkusios kauptis menkių kepenyse bei vyresnio amžiaus, didesnėse žuvyse.

Lietuvoje vykdytų SM kaupimosi gamtinėje aplinkoje sugautų žuvų audiniuose tyrimų rezultatų apžvalga

2003 m. Aplinkos ministerijos Jungtinis tyrimų centras (dabar Aplinkos apsaugos agentūra) inicijavo tyrimus, siekiant nustatyti SM (Cu, Zn, Cd, Cr, Ni, Mn, Pb, Hg) kiekius Lietuvos vidaus vandenų žuvų audiniuose. SM tyrimams, žuvis buvo gaudomos 15-oje upių ir 5-iuose ežeruose, kuriuose yra vykdomas paviršinio vandens monitoringas ir atliekami metalų tyrimai. Mėginiai, SM kiekio nustatymui žuvų audiniuose, buvo imami iš 1 metų amžiaus žuvų jauniklių ir iš 4-7 m. amžiaus žuvų: kuojos, ešerio, upėtakio ir gruzlio. Tyrimų rezultatai parodė, kad daugumoje upių ir ežerų, pagal šiuo metu reglamentuojamas SM normas, metalų kiekiai žuvų raumenyse neviršijo DLK, išskyrus Pb. Upėse, kurios priskiriamos lašišiniams vandens telkiniams, Pb kiekis žuvų raumenyse viršijo DLK Vilnios, Žeimenos ž. Pabradės, Minijos upėse, o taip pat ir Skroblaus upėje. Tirtose upėse ir ežeruose vidutiniškai SM ešerių, kuojų kepenyse ir raumenyse kaupėsi šiomis sekomis: kuojų ir ešerių raumenyse – Zn > Cu > Pb > Ni > Cr > Hg > Cd; kuojų kepenyse – Zn > Cu > Pb > Cr > Ni > Hg > Cd ir ešerių kepenyse – Zn > Cu > Pb > Hg > Cr > Ni > Cd. Pagal daugiamečius stebėjimus nustatyta, kad skirtingi SM skirtinguose žuvų audiniuose kaupiasi nevienodai, tai priklauso nuo rūšiai būdingų savybių. Pavyzdžiui, Cu intensyviau akumuliuoja kuojų kepenys, o ešerių kepenyse Cu kiekis gerokai nustatytas mažesnis. Ešerių kepenyse nustatytos aukščiausias Cd kiekis, tuo tarpu kuojų kepenyse šio metalo sukaupta nežymiai. Iš kitų tirtų SM, šiek tiek daugiau kepenyse sukaupiama Zn ir Cr. Kuojos raumenyse, lyginant su kitomis žuvų rūšimis, sukaupiama daugiau Zn ir mažiau – Mn.

Metalų kaupimosi dėsningumai ežerų ir upių žuvų audiniuose yra gana panašūs (Projekto sunkiųjų metalų kaupimasis, 2003).

2012–2014 m. Lietuvos nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute (NMVRV) metalų nustatymui buvo ištirti 670 žuvų mėginiai iš upių, ežerų, tvenkinių ir sūriųjų vandenių. Tik 1 mėginys neatitiko teisės aktų reikalavimų – Cd kiekis viršijo DLK į Lietuvą importuojamos jūrinės žuvų rūšies – sairos raumenų mėsoje (Žuvis ir jos maistinės savybės, 2014).

1.9. Metalų mišinių rizikos vertinimas

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama įvairių cheminių medžiagų mišinių (įskaitant ir SM mišinius) poveikiui žmonių sveikatai ir aplinkai. Europos Parlamentas nuolat atkreipia dėmesį, kad chemines medžiagas reglamentuojant ES teisės aktuose būtina atsižvelgti į suminį įvairių cheminių medžiagų poveikį (COM (2012) 252 final).

Kaip ir kitose pasaulio šalyse, ES cheminių medžiagų teisės aktai dažniausiai grindžiami atskirų cheminių medžiagų vertinimu. Tačiau esama ir ES teisės aktų, kuriais reglamentuojami įvairūs mišinių tipai:

- *Dirbtiniai mišiniai.* Tai mišinys, kurio sudėtis yra gerai žinoma, o vertinimas grindžiamas sudedamųjų dalių savybėmis ir viso produkto bandymais, jei jie atlikti.
- *Cheminių medžiagų iš vieno šaltinio mišiniai.* Gaminant, transportuojant, naudojant ar šalinant produktus, dažnai į aplinką patenka įvairių cheminių medžiagų mišinių. Jei jų sudėtis yra žinoma arba jei komponentus galima nustatyti analizės būdu, vertinimą galima atlikti remiantis žiniomis apie sudedamąsias jo dalis. Tačiau jei sudėtis nežinoma, mišinys turėtų būti vertinamas remiantis viso mišinio bandymais. Labai nedaugelyje ES teisės aktų reikalaujama įvertinti arba išbandyti visą mišinį. Vis dėlto Vandens pagrindų direktyvoje nustatytu reikalavimu pasiekti gerą vandens telkinių ekologinę ir

cheminę būklę atkreipiamas dėmesys ne tik į atskirų cheminių medžiagų koncentracijas, bet ir į suminių jų poveikį.

- *Cheminių medžiagų iš įvairių šaltinių, įvairiais būdais patenkančių į žmogaus organizmą arba aplinką, mišiniai.* ES teisėje yra tik keletas reikalavimų įvertinti įvairių medžiagų iš įvairių šaltinių mišinius, kurie ir yra Tarybos iškeltos problemos esmė. Pagal REACH ((EB) Nr. 1907/2006) parengtos įvairių šaltinių, iš kurių ta pati medžiaga (o tam tikrais atvejais – kelios labai susijusios arba panašiai veikiančios medžiagos, pvz., to paties metalo skirtingos druskos arba kelių labai susijusių organinių medžiagų dariniai), patenka į žmogaus organizmą arba į aplinką, vertinimo gairės.

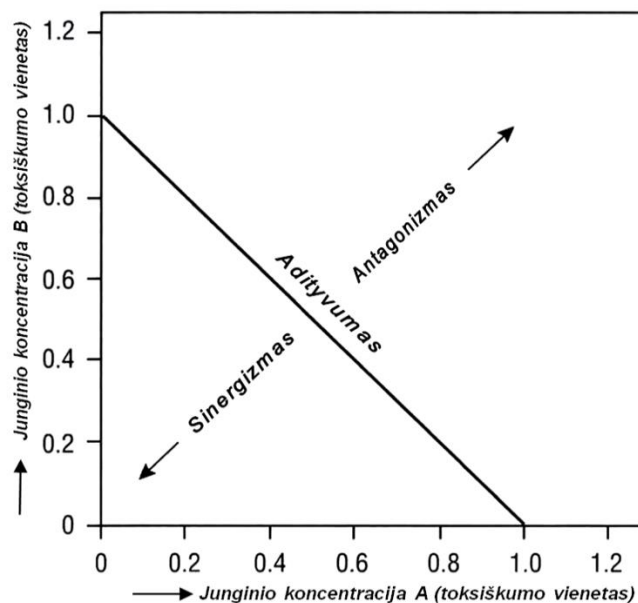
Darytina išvada, kad pagal ES teisės aktus vertinami ir reglamentuojami cheminių medžiagų mišiniai dažniausiai yra žinomos sudėties cheminiai produktai. Kontroliuojami ir kai kurie sudėtingi iš vieno šaltinio (gamyklos, įrenginio ir pan.) į aplinką išmetami arba išleidžiami galimi mišiniai. Yra keletas iš skirtingų šaltinių ir skirtingais būdais į žmogaus organizmą arba aplinką patenkančių įvairių medžiagų vertinimo ir kontrolės pavyzdžių, tačiau jų esama nedaug. Šiuo metu ES teisėje nėra numatyto sistemingo, išsamaus ir integruoto mišinių poveikio vertinimo metodo, kurį naudojant būtų atsižvelgiama į skirtingus medžiagų patekimo būdus ir mišinio sudedamųjų komponentų savybes.

Šiuo metu galioja labai išsami teisės aktų sistema, skirta užtikrinti, kad organizmus veikiančių *atskirų* cheminių medžiagų koncentracijos neviršytų nustatytų saugių ribų. Tačiau būtina žinoti bei įvertinti, ar iš skirtingų šaltinių ir skirtingais būdais į organizmą ir aplinką patenkančių cheminių medžiagų mišinys, kuriame medžiagų koncentracijos itin mažos, gali neigiamai paveikti žmonių sveikatą arba aplinką.

Mokslinių komitetų (Pavojų sveikatai ir aplinkai mokslinis komitetas (SAPMK), Atsirandančių ir nustatomų naujų pavojų sveikatai mokslinis komitetas (ANNPSMK), Vartotojų saugos mokslinis komitetas (VSMK))

teigimu, mišinyje esančios cheminės medžiagos tam tikromis sąlygomis viena kitos veikimą sustiprina taip, kad *pakinta bendras mišinio toksiškumo lygis*. Cheminės medžiagos, kurioms būdingas bendras veikimo būdas, gali sustiprinti viena kitos veikimą ir suminis jų poveikis bus aukštesnis nei kiekvienos mišinio sudedamosios dalies atskiras poveikis. Tačiau moksliniai komitetai padarė išvadą, kad kai medžiagų veikimo būdas skiriasi (jos veikia nepriklausomai viena nuo kitos), nėra pagrįstų įrodymų, kad šių cheminių medžiagų mišinys galėtų turėti neigiamą poveikį aplinkai, jei jį sudarančių atskirų cheminių medžiagų koncentracija neviršija saugaus lygio (pvz., DLK vandenyje). Tačiau padėtis, susijusi su ekologiniu poveikiu nėra tokia aiški. Moksliniai komitetai priėmė tokią išvadą: „*Apibendrinant, nevienodo veikimo mažos, tačiau galimai svarbios koncentracijos cheminių medžiagų mišinių ekologinis poveikis laikytinas galinčiu kelti susirūpinimą, net jei visų jame esančių cheminių medžiagų koncentracija neviršija prognozuojamos poveikio nesukeliančios koncentracijos ribų. Taigi yra poreikis tobulinti turimas žinias ir metodus bei kurti visapusiškas ekologinės rizikos vertinimo strategijas cheminėms medžiagoms, kurios gali kelti grėsmę realiomis sąlygomis*“ (COM(2012) 252 final).

Daugelio eksperimentinių tyrimų metu analizuojamas, kurio nors vieno ar dviejų metalų kaupimasis ir jų toksinis poveikis žuvų organizme, tačiau gamtinėje aplinkoje žuvis yra veikiamos metalų mišiniais. Tiek toksiškumo, tiek akumuliacijos atveju, tarp metalų mišinyje vyksta sąveika. Metalų poveikis mišinyje gali būti suminis (adityvus), didesnis už suminį (sinergetinis) arba mažesnis už suminį (antagonistinis) (7 pav.). Sąveika tarp cheminių medžiagų iš esmės gali paveikti organizme vykstančius svarbius fiziologinius procesus: medžiagų biologinį įsisavinamumą jų patekimą ir pernešimą, metabolizaciją, medžiagų surišimą jų jungimosi vietose bei sutrikdyti šalinimo procesus (Cedergreen 2014).



7 pav. Dviejų cheminių medžiagų galimos toksikologinės sąveikos mišinyje (Cedergreen 2014).

Manoma, kad cheminių medžiagų elgesys mišinyje gali būti prognozuojamas, naudojant cheminių medžiagų, kurios veikia panašiais mechanizmais, koncentracijos ar dozės didinimo arba jų poveikio didinimo modelius (angl. *concentration addition and effects addition*). Remiantis empiriniais duomenimis, daugelis tradicinių rizikos vertinimo metodų (pvz., pavojingumo indeksas (angl. *hazard index*), toksiškumo ekvivalentiškumo faktorius (angl. *toxic equivalency factor*) paremti mišinio komponentų koncentracijų didinimo modelių. Galima manyti, kad viso mišinio toksiškumas prognozuojamas, atsižvelgiant į atskirų komponentų toksiškumo lygį. Tačiau, dėl galimos sąveikos tarp mišinio komponentų ir jų jungimosi vietų, gali padidėti arba sumažėti mišinio toksiškumas nei buvo tikėtasi, todėl mišinio rizika gali būti reikšmingai neįvertinta. Tai itin svarbu, kai kalbama apie aplinkos cheminius mišinius, kuriuos sudaro neapibrėžtos sudėties chemikalai. Nesugebėjus tiksliai prognozuoti į aplinką išleidžiamos cheminės medžiagos toksiškos poveikį, ji aplinkoje gali sudaryti mišinius, kurie gali būti žalingi ekosistemai.

Akivaizdu, kad aplinkos biotiniai ir abiotiniai veiksniai gali stipriai pakeisti mišinio toksiškumą ir prognostinių metodų taikymo tikslumą, todėl

aplinkoje sutinkamų mišinių rizikos vertinimas yra sudėtingas uždavinys bet kuriam tyrėjui (Heys et al., 2016).

1.10. Metalų mišinių poveikis žuvims. Eksperimentinių tyrimų apžvalga

Eksperimentiniai tyrimai, kurių metu analizuojamas daugianarių SM mišinių poveikis žuvims, yra gana reti, fragmentiški, naudojamos skirtingos tyrimo metodikos ir matavimo procedūros, todėl gauti rezultatai sunkiai palyginami tarpusavyje. Išsamiau apžvelgti užsienio autorių tyrimai pateikti mokslinėje publikacijoje (Sauliūtė ir Svecevičius, 2015). Daugelyje tyrimų buvo analizuojamos metalų sąveikos mišiniuose, akumuliacijos dėsningumai žuvų audiniuose bei mišinių toksinis poveikis skirtingoms žuvų rūšims. Akivaizdu, kad iki šiol tyrėjai eksperimentams pasirenka skirtingas bandymo sąlygas. Tyrimai dažnai atliekami su viena žuvų rūšimi; naudojamos aukštos subletalinės-letalinės SM koncentracijos vandenyje; parenkama eksperimentiškai nepagrįsta ekspozicijos trukmė; naudojami atskiri metalai, binariniai, rečiau trinariai metalų mišiniai. Atlikta tik keletas darbų, kuriuose buvo naudojamas 5-ių komponentų metalų mišinys (3 lentelė). Žemiau trumpai aprašomos SM kaupimosi žuvų audiniuose tyrimo metodikos bei gauti tyrimo rezultatai.

Kim et al. (1977) tyrė Se galimą poveikį Hg akumuliacijai Didžiasnukių šapalų (*S. atromaculatus*) audiniuose. Pradžioje, bandymo žuvys 48 val. buvo veikiamos Se (3,0 mg/l), po to 48 val. Hg (0,01 – 0,16 mg/l). Nustatyta, kad Se yra efektyvus antagonistas Hg toksinio poveikio metu. Esant mažai Hg koncentracijai, Se padidino Hg akumuliaciją visame kūne. Tačiau veikiant žuvis šių metalų mišiniu (Se + Hg) ir esant aukštai Hg koncentracijai, sumažėjo Hg kiekis visame kūne.

Klaverkamp et al. (1983) tyrė Se poveikį Hg kaupimuisi lydekos (*E. lucius*) audiniuose. Bandymo žuvys buvo veikiamos 75, 96 ir 240 val. esant mažai Se koncentracijai (0,001 – 0,01 mg Se/l) ir aukštai (0,1 mg Se/l). Veikiant žuvis maža Se koncentracija, sumažėjo CH₃²⁰³Hg akumuliacija raumenyse, odoje, kauluose, kepenyse, o esant aukštai Se koncentracijai,

nebuvo pastebėtas reikšmingas Hg padidėjimas audiniuose, lyginant su kontroliniu Hg lygiu.

3 lentelė. Eksperimentinių tyrimų apžvalga (1978–2017 m.).

Bandymo sąlygos	SM koncentracija	Ekspozicijos trukmė	Žuvų rūšis	Šaltinis
Cd + Zn	0,0043 – 0,0085 mg Cd/l; 0,0734 – 0,139 mg Zn/l	30, 70 ir 100 parų	<i>Jordanella floridae</i>	Spehar et al., 1978
Cd, Ni, Cr atskirai Cd + Ni + Cr	0,01 mg Cd/l; 0,2 mg Cr/l; 1,0 mg Ni/l	270 parų	<i>Salmo gairdneri</i>	Calamari et al., 1982
Ni atskirai; Ni + Cr; Ni + Cu	50 – 100 mg Ni/l; 80 – 1,0 mg Cr/l; 80 – 1,0 mg Cu/l	4 – 6 val.	<i>Rutilus rutilus</i>	Van Hoof, Nauwelaers, 1984
Hg atskirai; Hg + Pb; Hg + Cd	0,05 – 0,2 mg Hg/l; 0,05 – 0,5 mg Pb/l; 0,05 – 0,1 mg Cd/l	45 paros	<i>Oreochromis aureus</i>	Allen 1994
Cd atskirai; Cd + Hg; Cd + Pb	0,05 – 0,10 mg Cd/l; 0,05 mg Hg/l; 0,05 – 0,5 mg Pb/l	140 parų	<i>Oreochromis aureus</i>	Allen 1995
Cd, Cu atskirai; Cd + Cu	0 – 0,07 ir 0 – 0,15 mg Cd/l; 0 – 0,15 ir 0 – 0,4 mg Cu/l	6 paros	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Pelgrom et al., 1994
Cu + Ag + Se+ Zn + Hg	0,0002 mg Hg/l – 0,1 mg Zn/l	12 parų	<i>Brachydanio rerio</i>	Ribeyre et al., 1995
Cu atskirai; Cu + Zn	0,014 mg Cu/l; 0,057 – 0,081 mg Zn/l	21 para	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Dethloff et al., 1999
Zn, Cd atskirai; Zn + Cd	0,1 – 1,0 mg Cd/l; 1,0 – 10 mg Zn/l	10 parų	<i>Tilapia nilotica</i>	Kargin, Çoğun, 1999
Zn, Cd atskirai; Zn + Cd	0,00001 – 0,067 mg Cd/l; 0 – 1,0 mg Zn/l	24 val.	<i>Danio rerio</i>	Wicklund Glynn 2001
Cd, Cu, Zn atskirai; Cd + Cu + Zn	1,0 mg metal/l	14 parų	<i>Oreochromis niloticus</i>	Eroglu et al., 2005
Pb atskirai; Pb + Cr	0,0001 mg Pb/l; 0,00015 mg Cr/l	60 parų	<i>Labeo rohita</i>	Ghosh et al., 2007
Cr + Ni	2,9 mg metal/l	7 paros	<i>Cirrhinus mrigala</i>	Palaniappan, Karthikeyan, 2009
Zn + Cu + Ni + Cd + Pb	0,0014 – 0,1 mg metal/l	3, 21, 28 ir 46 val.	<i>Danio rerio</i>	Komjarova, Blust, 2009a
Cu, Zn, Cd atskirai; Cu + Zn + Cd	5,0 mg Cu /l; 5,0 mg Zn /l; 1,0 mg Cd/l	24, 48 ir 96 val.	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tunçsoy, Erdem, 2014
Cu, Zn, Cd, Pb atskirai; Cu + Zn + Cd + Pb	5 mg Cu/l; 5 mg Zn/l; 1 mg Cd/l; 1 mg Pb/l	1, 7 ir 15 parų	<i>Clarias gariepinus</i>	Duran et al., 2015
Cu, Cd atskirai; Cu + Cd	0,075 mg Cu/l; 0,005 mg Cd/l	21 para	<i>Pimephales promelas</i>	Driessnack et al., 2016
Zn, Cd atskirai; Zn + Cd	0,007 mg Cd/l; 0,17 mg Zn/l	21 para	<i>Pimephales promelas</i>	Driessnack et al., 2017

Baltijos strimelių (*Clupea harengus membras*) ikrai buvo veikiami Cd, Cu ir Pb mišiniu (0,56 – 5,0; 0,0167 – 0,15 ir 0,56–5,0 mg SM/l, atitinkamai) jūros vandenyje 16 parų (Westernhagen et al., 1979). Buvo matuojamas

embrionų išgyvenamumas iki išsiritimo, metalo akumuliacija embrionuose ir ankstyvojoje lervučių stadijoje. Buvo stebimas Cu ir Cd antagonistinis poveikis žuvų embrionų išgyvenamumui, o Pb buvimas mišinyje nedarė jokio reikšmingo poveikio. Be to SM patekimo intensyvumas itin priklausė nuo SM koncentracijų santykio mišinyje. Poveikio metu buvo stebimas antagonistinis (7 iš 18) ir sinergetinis (11 iš 18) poveikis, veikiant ikrus Cd ir Cu mišiniu. Pb kaupimasis ikruose suintensyvėjo esant Cu mišinyje.

Nielsen ir Bjerregaard (1991) tyrė sąveikas tarp Cd ir Se, veikiant paprastųjų otų (*S. maximus*) jauniklius atskirais SM ir jų mišiniu (0,15 mg Cd/l ir 0,105 mg Se–SeO₃²⁻/l) 35 paras. Veikiant atskirais metalais, buvo stebimas Cd tiesiškas kaupimasis žuvų žarnyne, inkstuose ir kepenyse 5 sav. poveikio laike. Tuo tarpu Cd koncentracijos pusiausvyra žiaunose, odoje ir raumenyse buvo pasiekta po 1 – 3 sav. Plazmoje ir eritrocituose, Cd kaupimosi pusiausvyra pasiekta po 1 – 2 sav. poveikio. Veikiant Se atskirai, nebuvo stebimas reikšmingas Se kaupimasis žiaunose, odoje, kepenyse, raumenyse ir eritrocituose. Se koncentracija plazmoje nekito visą ekspozicijos laikotarpį. Veikiant Cd + Se mišiniu, padidėjo Cd kaupimosi greitis žiaunose, inkstuose ir kepenyse, tačiau sumažėjo Cd akumuliacija žarnyne ir eritrocituose; Cd kaupimasis blužnyje, odoje, raumenyse ir plazmoje nepakito. Se kaupimasis sumažėjo inkstuose ir plazmoje, tačiau šio elemento kaupimasis žiaunose, žarnyne, kepenyse, raumenyse ir blužnyje nepakito, lyginant su atskiro Se veikimu.

Gill et al. (1992) tyrė Cd poveikį Cu ir Zn akumuliacijos intensyvumui Amerikinio upinio ungurio (*A. rostrata*) žiaunose, kepenyse, inkstuose, žarnyne, raumenyse, širdyje ir smegenyse. Bandymo žuvis buvo veikiamos 16 sav. mažomis ir didelėmis subletalinėmis Cd koncentracijomis (0,075 ir 0,15 mg Cd/l, atitinkamai). Aukščiausias Cd lygis audiniuose nustatytas po 2 sav. poveikio. Priklausomai nuo poveikio koncentracijos, buvo stebimas tiesinis Cd kiekio padidėjimas visuose audiniuose, išskyrus inkstuose. Po 8 sav. poveikio, Cd kiekis audiniuose žymiai sumažėjo ir išliko tame pačiame lygyje iki 16 sav. poveikio pabaigos. Aukščiausias Cd kiekis nustatytas žiaunose ir inkstuose. Po

2 sav. poveikio, Cu (kepenyse ir širdyje) ir Zn (žarnyne ir kepenyse) kiekis audiniuose reikšmingai sumažėjo veikiant Cd. Po 16 sav. poveikio, Cu lygis tirtuose audiniuose (išskyrus kepenyse) grįžo iki kontrolinio lygio. Tuo tarpu Zn kiekis širdyje ir inkstuose, reikšmingai padidėjo veikiant Cd, lyginant su kontrolinėmis žuvimis. Galima daryti prielaidą, kad unguriai gali sumažinti Cd intoksikaciją ir atkurti Cu ir Zn normalų lygį, jei ekspozicijos trukmė yra pakankama (iki 16 sav.).

Pelgrom et al. (1995) tyrė SM kaupimosi dėsniumus tilapijos (*O. mossambicus*) organuose, eksponuojant žuvis Cu ir Cd atskirai ir jų binariniais mišiniais (0,005 Cd mg/l + 0,02 Cu mg/l ir 0,035 Cd mg/l + 0,1 Cu mg/l) veikiant 6 paras ir po 6 ir 11 parų veikiant mišiniais 0,02 Cd mg/l + 0,05 Cu mg/l. Tyrimų rezultatai parodė, kad Cd ir Cu kaupimasis buvo specifinis tiek SM, tiek audiniui. Buvo įvertinti SM kaupimosi reikšmingi skirtumai žuvų žiaunose, kepenyse, inkstuose, žarnyne ir lytinėse liaukose, lyginant binarinių mišinių (Cd + Cu) kombinacijų veikimą su atskirų metalų veikimu. Buvo stebima akivaizdi sinergetinė sąveika tarp Cu ir Cd, esant mažoms, aplinkai reikšmingoms metalų koncentracijoms.

Tao et al. (1999) tyrė Cu ir Pb poveikį Neoninei tetrai (*P. innesi*). Bandymo žuvis tuo pačiu metu arba paeiliui buvo veikiamos Cu (0,05 – 2,0 mg/l) ir Pb (0,4 – 1,6 mg/l) koncentracijomis 7 ir 20 parų. SM kiekis buvo nustatytas žuvų žiaunose ir visame kūne (be žiaunų) ekspozicijos pabaigoje. Nustatyta, kad Pb palengvina Cu patekimą ir atvirkščiai, kai žuvis veikiamos abiem metalais tuo pačiu metu. Tuo tarpu, veikiant paeiliui, pirmiausia Cu 7 paras, po to Pb 20 parų, stebimas Pb suintensyvėjęs kaupimasis žuvų žiaunose ir visame kūne esant Cu. Tai rodo įmanomą pakeitimą fiziologiniuose absorbcijos procesuose ir sinergetinį reiškinį, veikiant metalams tuo pačiu metu arba paeiliui.

Eroglu et al. (2005) analizavo galimas sąveikas tarp Cd, Cu, Zn kaupimosi metu, jų poveikį MT sintezei Nilinės tilapijos (*O. niloticus*) kepenyse. Bandymo žuvis buvo veikiamos 14 parų atskirais SM ir jų binariniais-trinariais mišiniais, pasirenkant skirtingas SM kombinacijas esant

1,0 mg metal/l koncentracijai tirpale. Tyrimo rezultatai parodė, kad SM kiekis kepenyse reikšmingai padidėjo veikiant žuvis mišiniais, išskyrus Zn, jam esant mišinyje sudarytame iš trijų komponentų. Tačiau nebuvo nustatyta koreliacinio ryšio tarp SM ir MT. Eksponuojant žuvis, Cd lygis kepenyse didėjo šia seka: kontrolė < Cd + Cu + Zn < Cd + Cu < Cd + Zn < Cd; Cu – Cd + Cu + Zn < kontrolė < Cu + Zn < Cu < Cu + Cd. Zn kaupimasis kardinaliai skyrėsi nuo kitų metalų, nes aukščiausias jo lygis nustatytas kontrolinių žuvų kepenyse.

Palaniappan ir Karthikeyan (2009) tyrė Cr akumuliaciją ir eliminaciją *C. mrigala* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenys. Nustatė, kad žuvų inkstai buvo pirmasis Cr organas-taikinys. Veikiant žuvis Cr + Ni mišiniu, esant subletaliniams SM koncentracijoms tirpale, nustatyta didesnis Ni kiekis (10 – 28 %) visuose audiniuose. Taip pat buvo stebimas Cr kaupimosi padidėjimas (7 – 12 %) audiniuose esant Ni mišinyje. Tai galėjo lemti atsiradusi sinergetinė sąveika tarp šių metalų (3 lentelė).

SM patekimo proceso pokyčiai – tai indikatorius SM sąveikų žuvų organizme. Komjarova ir Blust (2009a) analizavo SM patekimo į žuvų audinius proceso pokyčius trumpalaikio poveikio metu, veikiant zebražuves (*D. rerio*) SM mišiniu (Zn Cu, Ni, Cd, Pb) prie itin mažų, gamtinei aplinkai artimų koncentracijų ribų (3 lentelė). Nustatytos sinergetinės ir antagonistinės SM sąveikos žuvų žiaunose ir visame kūne. Nustatyta, kad kitų metalų buvimas mišinyje labiausiai veikė Cd ir Pb patekimą. Kadmio patekimo greitį slopino Zn, Cu ir Pb, o sustiprino Ni buvimas mišinyje. Tuo tarpu Pb patekimas žiaunose ir visame kūne reikšmingai suintensyvėjo esant Cd, Ni ir Zn. Esant Cu + Pb mišiniui, buvo stebimas netiesinis Cu padidėjimas žiaunose. Padidėjus Zn koncentracijai, buvo skatinamas Cu patekimas ir nuolat slopinama Ni akumuliacija žiaunose ir visame žuvų kūne. Autoriai padarė išvadą, kad SM patekimo iš aplinkos į žuvų audinius mechanizmai yra itin sudėtingi.

Komjarova ir Blust (2009b) analizavo vandens katijonų (Na^+ , Ca^{2+} , H^+) poveikį Cd, Cu, Ni, Pb, Zn patekimo į *D. rerio* žiaunas ir visą kūną greičius, veikiant SM mišiniu trumpą laiką (17, 22, 40 ir 48 val.). Bandyto žuvis buvo

veikiamos daugianariu SM mišiniu esant gamtinei aplinkai artimoms SM koncentracijoms: Zn – 0,0065; Cu – 0,0032; Ni – 0,0059; Cd – 0,0028; Pb – 0,0027 mg/l. Nustatyta, kad katijonų (Na^+ , Ca^{2+} , H^+) koncentracija vandenyje turėjo įtakos Cu, Cd ir Pb kaupimuisi žiaunose ir lėmė intensyvesnį Ni ir Zn kaupimąsi visame kūne.

Clemow and Wilkie (2015) tyrė fiziologinį ir toksikologinį poveikį vaivorykštiniams upėtakiams, veikiant žuvis SM binariniu mišiniu (Pb + Cd) minkštame-rūgščiame vandenyje. Tyrimo metu nustatyta sąveika tarp Pb ir Cd žuvų žiaunose, elektrolitų (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) ir rūgščių-šarmų pusiausvyra kraujyje, žuvų išgyvenamumas veikiant žuvis mažomis SM koncentracijomis (25 – 2400 nmol Pb/l; 6 – 24 nmol Cd/l) 3 – 10 parų poveikio laike. Tyrimo rezultatai parodė, kad esant mažoms Pb ir Cd koncentracijoms mišinyje, stebimas sinergetinis reiškinys, sutrikdantis vidinį Ca^{2+} pusiausvyros balansą. Tačiau žuvis linkusios aklimuotis prie mažų SM koncentracijų tirpale. Esant aukštesnėms metalų koncentracijoms, Pb slopina Cd patekimą. Šie rezultatai papildė žinias apie Pb ir Cd patekimo mechanizmą per žiaunų membraną, veikiant žuvis binariniu mišiniu ir atskirais metalais.

Metalų sąveikos buvo tiriamos Atlantinės lašišos (*S. salar*) žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse veikiant žuvis 14 parų daugianariu metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) mišiniu ir Ni, Cr, Pb atskirai (Svecevičius et al., 2014). Žuvis buvo veikiamos didžiausioms leistinoms SM koncentracijoms (DLK), kurios reglamentuojamos ES vidaus vandenims (2000/60/EC): Zn – 0,1; Cu – 0,01; Ni – 0,01; Cr – 0,01; Pb – 0,005 ir Cd – 0,005 mg/l. Nustatyta, kad SM kiekis audiniuose buvo reikšmingai aukštesnis (17 iš 24) lyginant su kontrolinėmis žuvimis. Metalai raumenyse ir žiaunose kaupėsi šia seka: Zn > Ni > Pb > Cu > Cr > Cd; kepenyse: Zn > Cu > Pb > Ni > Cr > Cd; inkstuose: Zn > Cu > Pb > Cr > Ni > Cd. Veikiant žuvis mišiniu, Ni, Cr ir Pb kaupimasis audiniuose visais atvejais (6 iš 6) reikšmingai padidėjo, lyginant su atskirų metalų veikimu. Tai įrodė atsiradusi sinergetinė sąveika tarp tiriamų metalų.

Taip pat analogiškais kontroliuojamomis bandymo sąlygomis buvo analizuojamas SM kaupimasis Sidabrinio karoso (*C. gibelio*) žiaunose,

kepenyse ir raumenyse (Svecevičius et al., 2014). SM audiniuose kaupėsi šia seka: raumenys > žiaunos > kepenys. Metalų kaupimosi sekos audiniuose kardinaliai skyrėsi nuo sekų, įvardintų kitų tyrėjų atliktų tyrimų rezultatuose. Tam įtakos galėjo turėti tai, kad žuvys buvo eksponuojamos stovinčio vandens sąlygomis. SM buvo linkę kauptis raumenyse, t. y., priešingai nei nurodoma apžvelgtuose darbuose, kur metalai linkę kauptis kituose žuvų audiniuose.

Tomis pačiomis kontroliuojamomis bandymo sąlygomis buvo tiriamas SM kaupimasis ir kitų rūšių žuvų – kuojos (*R. rutilus*), ešerio (*P. fluviatilis*), šlyžio (*N. barbatulus*) ir vaivorykštinio upėtakio (*O. mykiss*) audiniuose (Idzelis et al., 2008, 2010). Kuojos ir ešeriai SM kaupė šia seka: kepenys > raumenys > žiaunos; šlyžys – žiaunos > kepenys > raumenys, o upėtakis – raumenys > kepenys > žiaunos. Kaip matyti, skirtingos žuvų rūšys skirtingai kaupė metalus savo audiniuose.

Biotinis ligando modelis (BLM) buvo kuriamas atskiriems metalams, tam kad būtų galima reguliuoti SM koncentraciją hidroekosistemoje. Tačiau gamtinėje aplinkoje gyvieji organizmai dažnai veikiami metalų mišiniais, todėl neseniai buvo atlikta keletas tyrimų, kurių metu buvo siekiama pradėti kurti BLM metalų mišiniais. Atliktų tyrimų rezultatai įrodo, kad SM mišinyje sąveikauja ne tik su vandens katijonais (pvz., Na⁺, Ca²⁺), tačiau ir tarpusavyje. Brix et al. (2016) vaivorykštinius upėtakius veikė skirtingų kombinacijų binariniais mišiniais (Ag, Cu, Ni) bei naudojo standartinį 3 val. metalų surišimo žiaunose įvertinimo metodą. Žuvys buvo veikiamos SM koncentracijų ribose, kurios būdingos toksiškumo LC50 (96 val.) testui. Nustatyta, kad SM, kurie turi panašų veikimo mechanizmą, sąveikavo, tačiau buvo nustatyta tik vienos krypties sąveika tarp SM (pvz., Cu slopino Ag kaupimąsi, tačiau Ag neturėjo įtakos Cu kaupimuisi). Taip pat buvo nustatyta sąveika tarp metalų, kuriems būdingas vienodas patekimo kelias. Metalai skatino vienas kito kaupimąsi audiniuose. Tokių sąveikų mechanizmai iki šiol išlieka neaiškūs. Todėl nėra korektiška teigti, kad SM sąveika žuvų žiaunose atsiranda tik dėl vienodo SM patekimo kelio. Atitinkamai, prieš kuriant BLM mišiniais, būtina išsiaiškinti visas galimas SM sąveikas mišiniuose ir jų atsiradimo priežastis.

1.11. Apibendrinimas

Apžvelgtų tyrimų rezultatai rodo, kad metalų kaupimasis žuvų audiniuose veikiant metalų mišiniais gali būti kitoks, nei veikiant atskirais metalais. Be to, tyrimų rezultatams didelės įtakos turi pasirinkta tyrimo metodika. Daugelio autorių nuomone, būtent dėl šių priežasčių yra gana sunku sukurti vieningą modelį, kuris leistų įvertinti ir prognozuoti galimas metalų sąveikas mišiniuose. Metalų sąveika žuvų organizme yra sudėtingas procesas, priklausantis tiek nuo biotinių, tiek nuo abiotinių veiksnių. Sąveika tarp metalų vyksta tiek akumuliacijos, tiek toksinio poveikio metu. Vieno metalo buvimas mišinyje gali padidinti arba sumažinti kito metalo kaupimąsi audinyje. Šie procesai priklauso nuo metalo cheminės prigimties, žuvų rūšies, tiriamo organo/audinio, mišinio tipo (binarinis, trinaris, daugianaris), metalų koncentracijos tirpale, poveikio trukmės ir vandens fizikinių-cheminių rodiklių.

Apžvelgtų tyrimų metodikos yra gana skirtingos, o tai yra didelis trūkumas aiškinantis SM kaupimosi žuvų audiniuose mechanizmus. Daugelis tyrėjų, norėdami gauti statistiškai patikimą rezultatą, dažnai žuvis veikia itin aukštomis, artimomis letalinėms ar netgi letalinėmis SM koncentracijomis, kurios neegzistuoja ar itin retai pasitaiko net ir labai užterštuose vandenyse. Gerai žinoma, kad gamtinėmis sąlygomis SM koncentracijos vandenyje yra gana mažos (Komjarova and Blust, 2009a, 2009b). Todėl vargu, ar tokių eksperimentinių tyrimų duomenys gali būti ekstrapolijuojami gamtinėms sąlygoms, nebent – atsitiktinio avarinio išsiliejimo atveju. Metalų sąveikos mišinyje bei kaupimasis audiniuose, veikiant žuvis mažomis koncentracijomis, gali labai skirtis nuo procesų, vykstančių esant aukštomis koncentracijoms. Duomenų apie SM kaupimąsi žuvyse, veikiant metalų mišiniais su realiomis, t. y., gamtinei aplinkai artimomis SM koncentracijomis, yra mažai. Atlikta tik keletas tokio pobūdžio tyrimų (Pelgrom et al., 1995; Ribeyre et al., 1995; Komjarova and Blust, 2009a, 2009b). Taip pat, tyrimai dažniausiai atliekami tik su kuria nors viena žuvų rūšimi. Parenkamas neapibrėžtas, niekuom nepagrįstas, nuo kelių valandų iki kelių mėnesių trunkantis ekspozicijos

laikotarpis, neatsižvelgiant į SM koncentracijos pusiausvyros (angl. *steady-state*) tarp vandenyje ir žuvų audiniuose esančių SM koncentracijų pasiekimo trukmę.

Daugelis SM akumuliuojasi žuvų audiniuose tyrimų atlikti su atskirais metalais, rečiau – su binariniais ar trinariais SM mišiniais. Tačiau, norint tiksliau prognozuoti metalų elgesį mišinyje, jų kaupimosi žuvų audiniuose dėsninumus bei toksinį poveikį žuvims, būtina atlikti kuo daugiau tyrimų naudojant daugianarius, skirtingų kombinacijų SM mišinius, kuriuose SM koncentracijos būtų artimos gamtinei aplinkai. Eksperimentinius tyrimus būtina atlikti su įvairiomis, skirtingos taksonomijos bei fiziologijos žuvų rūšimis, kadangi, kaip jau buvo įrodyta kitų tyrėjų, skirtingų rūšių žuvis tuos pačius SM akumuliuoja nevienodai. Tokių tyrimų rezultatai leistų tiksliau nustatyti leistinas ribines vertes konkreitiems metalams, atsižvelgiant į kitų metalų buvimą aplinkoje.

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Įvairios žuvų rūšys tarpusavyje gali būti glaudžiai susijusios ir gyventi tame pačiame areale, tačiau SM audiniuose gali kaupti labai skirtingai (Luoma and Rainbow, 2005). Todėl darbui pasirinktos skirtingoms taksonominėms grupėms priklausančios, savitais poreikiais fizinei buveinei bei maisto objektams pasižyminčios žuvų rūšys. Parenkant rūšis atsižvelgta ir į ankstesnių tyrimų duomenų apie SM kaupimąsi audiniuose buvimą.

➤ Atlantinė lašiša (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) – kaulinių žuvų (*Osteichthyes*) antklasio, lašišažuvių (*Salmoniformes*) būrio, lašišinių (*Salmonidae*) šeimos žuvų rūšis. Praeivė žuvis, iš Baltijos jūros plaukia neršti į upių sraunumas, po neršto grįžta į jūrą. Neršdamos lašišos nesimaitina. Iš ikrelių išsiritusios žuvis nepanašios į suaugusias, išilgai jų šonų, išsidėstę nuo 7 iki 13 pilkšvų dėmių tarp kurių yra rausvų taškelių, dėl to jos vadinamos margiukėmis.



8 pav. Lašių (*Salmo salar* L.) jauniklis (margiukė) (dešinėje autorės nuotr.).

Margiukės gėluose vandenyse gyvena 2 – 3 m., po to virsta sidabrinukėmis-smoltais ($l \geq 10 - 15$ cm), kurios keliauja atgal į jūrą (katadrominė migracija). Upėse margiukės minta įvairiu gyvūninės kilmės maistu (vandens bestuburiais, į vandenį įkritusiais vabzdžiais, kitų rūšių žuvų jaunikliais), o tipiškomis plėšrūnėmis tampa tik suaugusios lašišos (Virbickas 1986).

➤ Paprastoji kuoja (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758) – kaulinių žuvų (*Osteichthyes*) antklasio, karpžuvių (*Cypriniformes*) būrio, karpinių (*Cyprinidae*) šeimos gėlavandenė žuvų rūšis. Tai euritopinė rūšis, gyvena tiek

stovinčio, tiek ir tekančio vandens telkiniuose, tačiau didelės srovės vengia. Kuojos yra visaėdės žuvis. Minta vandens augalais ir įvairiais vandenyje gyvenančiais gyvūninės kilmės organizmais (smulkiais moliuskais, kirmėlėmis, vabzdžių lervomis ir kt.). Augalinės ir gyvūninės kilmės maisto proporcijos kuojų dietoje kinta priklausomai nuo maisto objektų prieinamumo. Kuojos – lėtai augančios žuvis, subręsta 3 – 5 m., kai $l \geq 12 - 15$ cm (Virbickas 1986).



9 pav. Paprastoji kuoja (*Rutilus rutilus* L.) (Autorės nuotr.).

➤ Paprastasis europinis ešeris (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) – kaulinių žuvų (*Osteichthyes*) antklasio, ešeržuvių (*Perciformes*) būrio, ešerinių (*Percidae*) šeimos gėlavandenė žuvis rūšis. Ešeriai – euritopai, paplitę ežeruose ir upėse, tačiau upėse dažnesni lėtos srovės atkarpose. Auga lėtai, subręsta būdami 3 – 4 m. amžiaus, kai $l \geq 9 - 15$ cm.



10 pav. Paprastasis europinis ešeris (*Perca fluviatilis* L.) (Autorės nuotr.).

Minta tik gyvūninės kilmės maistu: ešerių jaunikliai – vėžiagyviais, kitais bestuburiais, tačiau su amžiumi vis didesnę raciono dalį sudaro kitų rūšių žuvis. Vandens telkinyje trūkstant maisto, minta smulkesniais savo pačių gentainiais (Virbickas 1986).

Pasirinktų trijų rūšių žuvų audiniuose vykdytas šešių sunkiųjų metalų – Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd kaupimosi dėsningumų tyrimas. Tyrimas vykdytas gamtinėmis ir eksperimentinėmis sąlygomis.

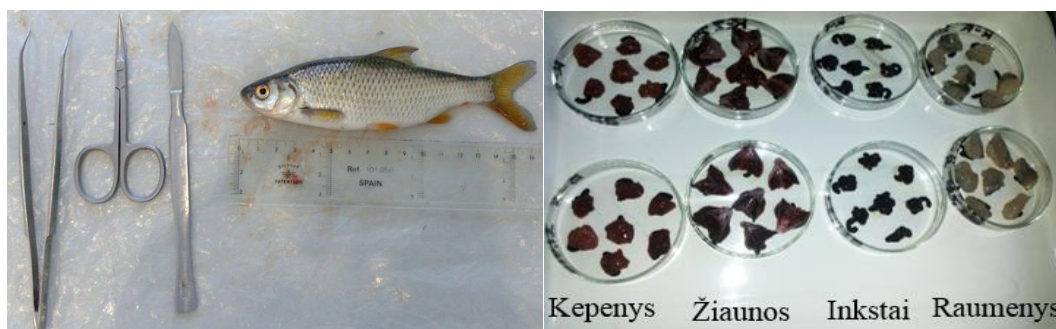
2.2. Tyrimo struktūra

Prieš pradėdant vykdyti eksperimentinį tyrimą, būtina žinoti kas vyksta gamtinėje aplinkoje, į ką labiausiai reikėtų atkreipti dėmesį, kad eksperimentinį tyrimą būtų galima kuo labiau priartinti prie realių – gamtinei aplinkai būdingų sąlygų. Todėl gamtinio tyrimo metu buvo siekiama nustatyti analizuojamų metalų kaupimosi žuvų audiniuose pagrindinius dėsningumus, rezultatus lyginant su kitų tyrėjų gautais rezultatais.

Gamtinis tyrimas vykdytas 2012–2013 m. Metalų bioakumuliacija tirta Kairių sąvartyno hidroekosistemoje gyvenančių *P. fluviatilis* ir *R. rutilus* audiniuose bei Vilnios ir Siesarties upėse *S. salar* audiniuose.

Eksperimentinis tyrimas vykdytas 2013–2016 m. Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Hidrobiontų ekologijos ir fiziologijos laboratorijoje. Skirtingos žuvų rūšys (*S. salar*, *R. rutilus*, *P. fluviatilis*) buvo eksponuojamos skirtingų kombinacijų daugianariuose, iš 6 metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) sudarytuose mišiniuose, tomis pačiomis kontroliuojamomis bandymo sąlygomis. SM kaupimasis tirtas aplinkos rizikos vertinime (ARV) dažniausiai naudojamuose žuvų audiniuose – žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse. Eksperimentinis tyrimas vykdytas 4-iais etapais: pirmojo etapo metu parinktas gamtinės sąlygas labiausiai atitinkantis eksperimento dizainas; antrojo etapo metu nustatyta optimali ekspozicijos trukmė, kurią pasiekus SM koncentracijos žuvų audiniuose reikšmingai nebedidėja; trečiojo etapo metu vykdytas SM kaupimosi dėsningumų tyrimas skirtingų žuvų rūšių audiniuose, veikiant žuvis 7-iais skirtingais daugianariais metalų mišiniais, esant tai pačiai ekspozicijos trukmei; ketvirtojo etapo metu nustatyta metalotioneinų (MT) koncentracija skirtingų žuvų rūšių kepenyse ir inkstuose po ekspozicijos daugianariame SM mišinyje.

Tiek gamtinio, tiek eksperimentinio tyrimo metu, prieš atliekant tolimesnius tyrimus, iš vandens išimtomis žuvis buvo atlikta kontuzija (Direktyva 2010/63/ES). Po to buvo matuojamas kiekvienos žuvies bendras ilgis L (mm), standartinis ilgis l (mm), nustatomas bendras svoris Q (g) ir svoris be vidaus organų q (g) bei imami audinių mėginiai tolimesnei analizei (11 pav.). Analizei paimtos ir pasvertos ($\pm 0,001$ g tikslumu): žiaunos (visas audinys), kepenys (visas organas), inkstai (visas organas) ir raumuo be odos.



11 pav. Žuvų morfometrinė analizė ir audinių paėmimas (Autorės nuotr.).

2.3. Metalų kaupimosi gamtinėje aplinkoje gyvenančiose žuvyse tyrimas

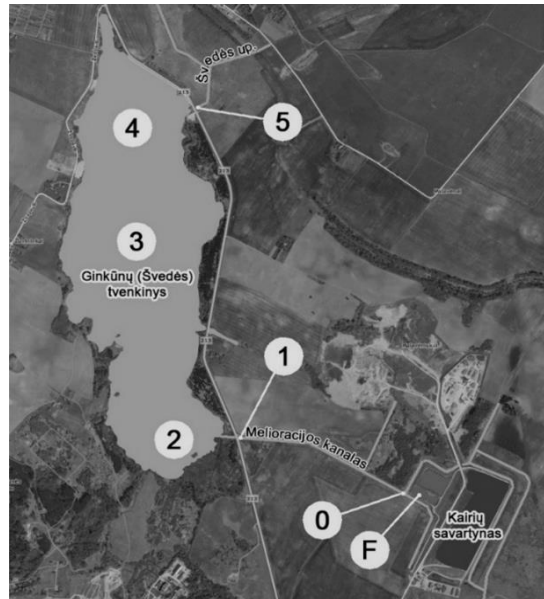
2.3.1 Metalų kaupimosi Kairių sąvartyno hidroekosistemoje gyvenančių žuvų audiniuose tyrimas

Kairių sąvartynas nuo Šiaulių miesto nutolęs 5 km ($55^{\circ}55'42.7''$, $23^{\circ}23'42.81''$, WGS). Sąvartynas pradėtas eksploatuoti 1960 m., uždarytas 2007 m. Sąvartyne buvo kaupiamos miesto ir apylinkių buitinės, komunalinės ir pramoninės atliekos. Iš sąvartyno vis dar sunkiasi filtratas, kuris yra nukreipiamas į 2 izoliuotus lauko rezervuarus. Manoma, kad filtratas iš šių rezervuarų gali prasiskverbti per pralaidžius dirvožemio sluoksnius ir patekti į gretimą vandens telkinį.

Kairių sąvartyno hidroekosistemą sudaro sąvartyną apjuosiantis melioracijos kanalas, kuris už 1,5 km įteka į Ginkūnų (Švedės) tvenkinį (1,1 km² ploto) ir iš tvenkinio ištekantis Švedės upelis (12 pav.).

Metalų analizei, *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* mėginiai surinkti 2012–2013 m, šešiose hidroekosistemos vietose, skirtingu atstumu nutolusiomis nuo filtrato rezervuarų vandens srauto tekėjimo kryptimi (12 pav.). Melioracijos kanale ir

Švedės upelyje (0, 1, 5 st.) tyrimams žuvų mėginiai surinkti elektros žūklės metodu (naudotas HANS GRASSL GmbH gamybos (Vokietija) IG 200/2 serijos Lietuvoje registruotas elektros žūklės aparatas), Ginkūnų tvenkinyje (2, 3, 4 st.) – statomaisiais atrankiniais tinklais. Mėginių rinkimo vietų koordinatės, atstumas iki taršos šaltinio (taško F), sugautų individų ir sudarytų mėginių skaičius tyrimo stotyse pateikiami 4 lentelėje.



12 pav. Mėginių surinkimo stotys Kairių šavartyno hidroekosistemoje: Kairių šavartyno filtrato rezervuaras (F); melioracijos kanalas (0, 1); Ginkūnų (Švedės) tvenkinys (2, 3, 4); Švedės upelis (5).

4 lentelė. Tyrimų vietų charakteristika vandens telkiniuose 2012–2013 m.

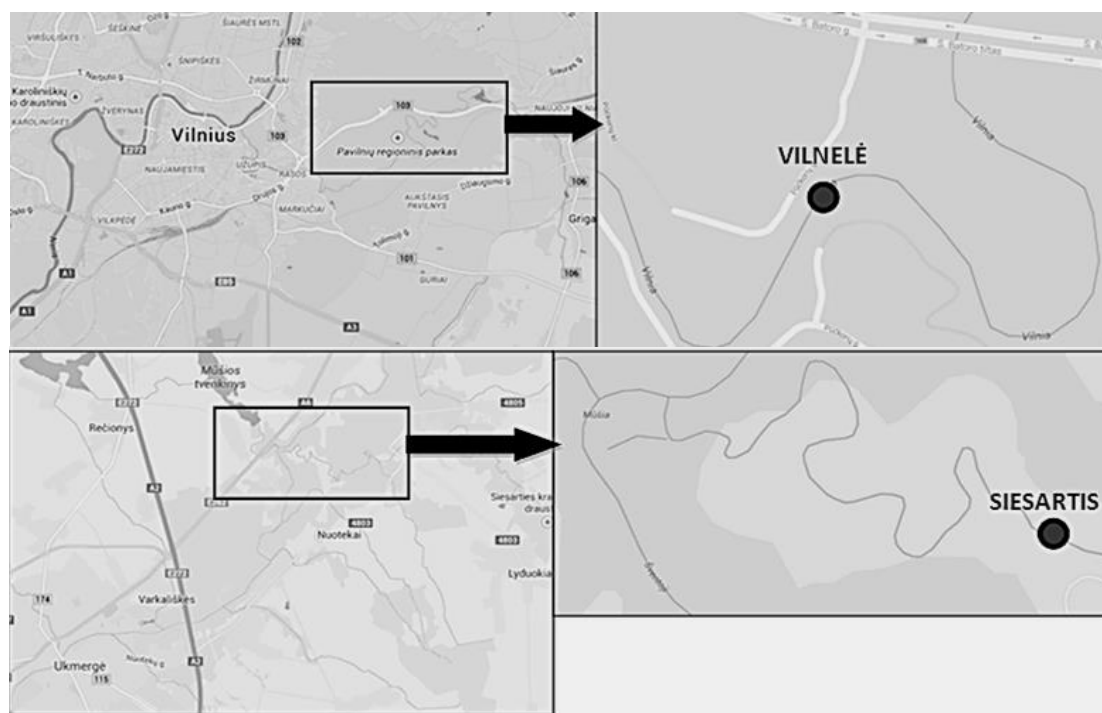
Stotis	Vandens telkinys	Mėginių ėmimo vietos koordinatės	Atstumas iki taršos šaltinio, m	Rūšis	Individų skaičius	Mėginių skaičius
Nr. 0	Melioracijos kanalas	55° 55' 46.87", 23° 23' 24.64"	10	<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	0 0	– –
Nr. 1	Melioracijos kanalas	55° 55' 55.44", 23° 22' 39.15"	800	<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	1 7	1 2
Nr. 2	Ginkūnų tvenkinys	55° 55' 53.83", 23° 22' 22.04"	1300	<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	7 9	2 3
Nr. 3	Ginkūnų tvenkinys	55° 56' 26.57", 23° 22' 12.62"	2200	<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	9 9	3 3
Nr. 4	Ginkūnų tvenkinys	55° 56' 46.75", 23° 22' 9.7"	2900	<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	9 9	3 3
Nr. 5	Švedės upelis	55° 56' 47.57", 23° 22' 27.00"	3200	<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	6 0	2 –
Viso:				<i>P. fluviatilis</i> <i>R. rutilus</i>	32 34	11 11

Metallų kaupimosi analizei, atrinkti panašaus ilgio ir svorio individai. Metalai tirti žuvų žiaunose, kepenyse ir raumenyse.

Žuvų mėginių surinkimo stotyse taip pat buvo paimti vandens mėginiai vandens fizikinių-cheminių rodiklių nustatymui. Nustatyti anijonai (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , NO_2^- , NO_3^-) (mg/l), katijonai (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+) (mg/l), ištirpęs O_2 , pH, druskingumas (‰), elektrinis laidis ($\mu\text{S}/\text{cm}$), bendras vandens kietumas pagal CaCO_3 (mg/l), temperatūra ($^\circ\text{C}$), sunkiųjų metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) koncentracija ($\mu\text{g}/\text{l}$). Vandens fizikiniai-cheminiai rodikliai nustatyti sertifikuotoje laboratorijoje laikantis ISO standartų (ISO 15586:2003; ISO 6332:1988; ISO 5814:1990; ISO 10523:2008; ISO 14911:1998; ISO 10304-1:2007; ISO 9963-1:1994; ISO 7888:1985).

2.3.2 Metalų kaupimosi Vilnios ir Siesarties upių laišų audiniuose tyrimas

Metalų analizei *S. salar* jaunikių mėginiai buvo renkami 2013 m. gruodžio mėn. naudojant sertifikuotą elektros žūklės aparatą (HANS GRASSL GmbH IG 200/2, Vokietija). Mėginiai rinkti Vilnios upės žemupyje, žemiau Naujosios Vilnios (ties Stepono Batoro tiltu; Vilniaus m.) [$54^\circ 41' 25.67''$, $25^\circ 21' 33.31''$ (WGS)] bei Siesarties upės žemupyje, ties Vaisgeliškių km. (Ukmergės raj.) [$55^\circ 17' 24.67''$, $24^\circ 51' 54.67''$ (WGS)] (13 pav.).



13 pav. *Salmo salar* eksperimentinės žūklės vietos Vilnios ir Siesarties upėse.

Vilnia teka per urbanizuotą miesto teritoriją, praeityje gana smarkiai teršta buitinėmis, pramoninėmis bei paviršinėmis lietaus nuotekomis (Gailiušis et al., 2001). Siesarties upės baseine reikšmingų taršos šaltinių nėra. Abi upės yra tipiški lašišiniai vandens telkiniai, jose vykdomas lašišinių žuvų monitoringas (Praeivių žuvų būklės... 2009).

Metalų kaupimosi nustatymui, Vilnios ir Siesarties upėse, buvo sugauta po 10 individų 1+ amžiaus lašių jauniklių (Sauliutė ir Svecevičius, 2017). Metalai nustatyti *S. salar* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse.

Žuvų fiziologinei būklei įvertinti ir palyginti skirtingose lašišinėse upėse, apskaičiuoti žuvų morfologiniai rodikliai: ėmitimo koeficientas (angl. *Condition Factor*) (*IK*), visceralinis, žiaunų, kepenų, inkstų somatiniai indeksai (*VSI*, *ŽSI*, *KSI*, *ISI*, atitinkamai).

Ėmitimo koeficientas lašišinėms žuvims (*IK*) parodo žuvies masės ir kūno ilgio santykį. Apskaičiuotas pagal formulę (Barnham and Baxter, 2003):

$$IK = \frac{10^N \cdot Q}{l_c^3}; \quad (2.1)$$

kur *Q* – žuvies bendras svoris, g; *N* – vertė (*N* = 5) parinkta, siekiant gauti kuo artimesnę vienetui *IK* vertę; *l_c* – kaudalinis ilgis, mm (lašišinių žuvų kūno ilgis matuojamas nuo snukio pradžios iki uodeginio peleko iškirptės centro (angl. *fork length*)).

Organo-somatinis indeksas (*OSI*) išreiškiamas konkretaus organo ir kūno masės santykiu procentais (Liebel et al., 2013):

$$OSI = (\text{drėgnas organo svoris, g}) \times 100 / (\text{viso kūno svoris, g}); \quad (2.2)$$

Vandens mėginiai metalų koncentracijos nustatymui upių vandenyje buvo paimti ties abiem upių krantais ir vagos viduryje (*n* = 3). Suspenduotų kietųjų dalelių pašalinimui vandens mėginiai buvo filtruojami per 0,45 μm filtrus (Millipore), po to parūgštinti azoto rūgštimi (galutinė koncentracija 0,5 % v/v) ir 10 kartų sukonzentruoti karšto oro krosnyje. Mėginiuose SM koncentracija nustatyta laikantis ISO standarto (ISO 15586:2003). Informacija apie kitus, 2013 m. išmatuotus upių vandens fizikinius-cheminius rodiklius gauta iš

Lietuvos Respublikos Aplinkos Ministerijos Vilniaus regiono aplinkos apsaugos departamento (duomenys nepublikuoti).

2.4. Metalų kaupimosi žuvų audiniuose eksperimentiniai tyrimai

Eksperimentiniai tyrimai buvo atliekami su dirbtinai veistais *S. salar* jaunikliais (1+) (Meškerinės lašišinių žuvų veislynas (Švenčionių raj.)) ir *R. rutilus* bei *P. fluviatilis* 3 – 4 m. amžiaus nesubrendusiomis žuvimis (UAB „Bartžuvė“ žuvininkystės ūkis (Elektrėnų sav.)). Prieš pradėdant eksperimentinius tyrimus, atsivežtos žuvys buvo aklimuojamos prie laboratorinių sąlygų 14 parų pratakiose 1000 l talpos aeruojamuose baseinuose, į kuriuos vanduo tiekiamas iš artezinių gręžinių (minimalus debitas 1 l/g jų kūno masės per dieną). Žuvis buvo laikomos esant natūraliam apšvietimui bei maitinamos komerciniu lašišinėms žuvims skirtu pašaru (ALLER PLATINUM) kiekvieną dieną, ryte. Bendras maisto kiekis buvo ne mažesnis kaip 1 % jų kūno masės per dieną. Visą ekspozicijos laiką žuvis buvo maitinamos tuo pačiu būdu. Eksperimentai buvo pradėdami, kai žuvis normaliai elgėsi ir maitinosi.

Tyrimų metu (žr. 2.4.1; 2.4.2; 2.4.3; 2.4.4), žuvis buvo veikiamos standartiniu eksperimentiniu daugianariu metalų mišiniu (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) (MIX), kuris paruoštas pagal didžiausias leistinas SM koncentracijas (DLK), kurios reglamentuojamos ES vidaus vandenims (2000/60/EC) (5 lentelė).

5 lentelė. Sunkieji metalai ir jų bandymo koncentracijos (mg/l) (2000/60/EC).

SM	Šaltinis	Koncentracija (mg/l)	
		DLK nominali	Išmatuota (vidurkis ± standartinis nuokrypis)
Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,115 ± 0,014
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	0,009 ± 0,001
Ni	NiSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,011 ± 0,002
Cr	K ₂ Cr ₂ O ₇	0,01	0,012 ± 0,002
Pb	Pb(NO ₃) ₂	0,005	0,0045 ± 0,0004
Cd	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	0,005	0,0052 ± 0,0003

Tirpalai paruošti naudojant cheminei analizei skirtas SM druskas («REACHIM», Rusija). Pradinis (koncentruotas) tirpalas buvo ruošiamas

ištirpinant reikiamą druskos kiekį distiliuotame vandenyje, o galutinė koncentracija bandymo talpose perskaičiuojama pagal sunkiojo metalo jono kiekį. Švarus vanduo (kontrolė) ir bandymo tirpalai buvo atnaujinami kiekvieną dieną po žuvų maitinimo.

Eksperimento metu, SM koncentracija bandymo vandenyje (angl. *blank test*) (be žuvų; $n = 3$) buvo matuojama atominės absorbcijos spektrofotometru (SHIMADZU AA 6800, Japonija), naudojant grafitinės krosnies metodą. Kiekvienas vandens mėginys buvo parūgštintas azoto rūgštimi (galutinė koncentracija 0,5 % v/v), o SM koncentracija mėginyje nustatyta laikantis ISO standarto (ISO 15586:2003). Mėginys buvo analizuojamas 3 kartus. Vidutinė išmatuota koncentracija svyravo tarp 5 – 20 % tikslinės koncentracijos ribose (5 lentelė).

Viso eksperimento metu buvo naudojamas artezinis gręžinio vanduo, kurio fizikiniai-cheminiai rodikliai pateikiami 6 lentelėje. Vandens temperatūra, ištirpęs O₂, pH buvo matuojami reguliariai rankiniu multimetru (WTW Multi 340i/SET, Vokietija).

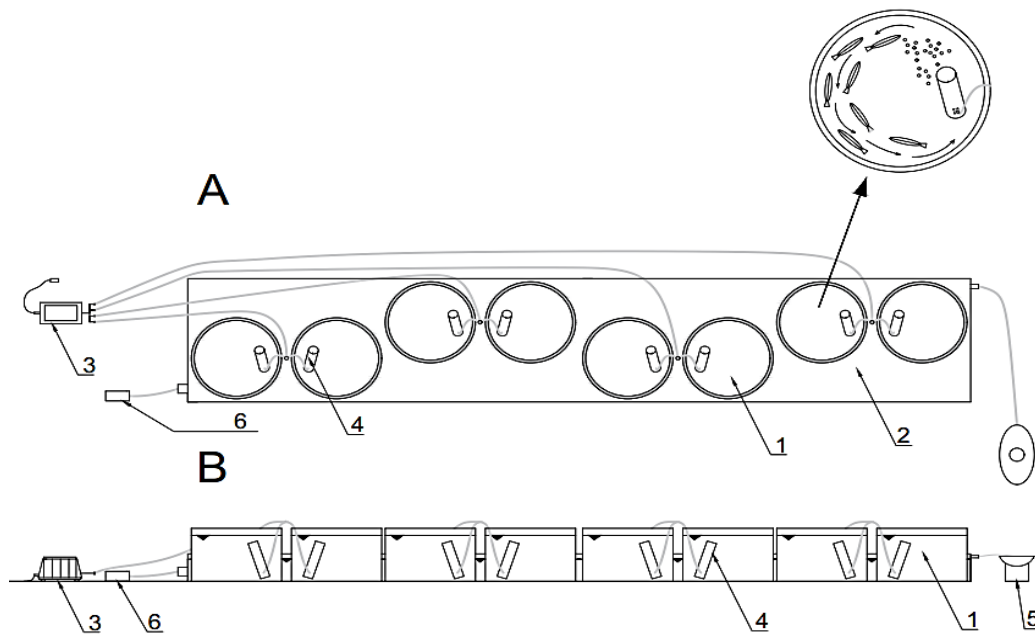
6 lentelė. Artezinio gręžinio vandens fizikiniai-cheminiai rodikliai.

Fizikiniai-cheminiai rodikliai							
Metalai, mg/l		Katijonai, mg/l		Anijonai, mg/l		Kitos analizės	
Mn	0,068	Na ⁺	3,2	Cl ⁻	3,7	pH	7,9 – 8,1
Zn	0,0128	K ⁺	1,2	SO ₄ ²⁻	18,4	Temperatūra	12 – 13 °C
Cu	< 0,001	Ca ²⁺	70,1	HCO ₃ ⁻	258	Ištirpęs O ₂	10 mg/l
Cr	< 0,001	Mg ²⁺	16,5	CO ₃ ⁻	0,18		
Ni	< 0,002	Fe ²⁺	0,1	NO ₂ ⁻	< 0,010		
Pb	< 0,001	Fe ³⁺	< 0,01	NO ₃ ⁻	< 0,050		
Cd	< 0,0003	Fe _{Bendra}	0,1				
		NH ₄ ⁺	0,361				

2.4.1 Eksperimentinės sistemos parinkimas

Šis tyrimas buvo vykdomas (2013–2014 m.) su *S. salar* jaunikliais. Pirmiausia žuvis buvo eksponuojamos *stovinčio vandens* eksperimentinėje sistemoje. Šią sistemą sudarė penki 30 l talpos stikliniai akvariumai (20 x 30 x 50 cm) į kuriuos buvo suleista po 7-is individus. Akvariumai buvo pripildyti 2/3 tūrio nuolat aeruojamo vandens. Žuvis 14 parų buvo veikiamos standartiniu daigianariu SM mišiniu (MIX) (Svecevičius et al., 2014).

Po to analogiškoms kontroliuojamoms bandymo sąlygoms, *S. salar* buvo eksponuojamos *besisukančio vandens* sąlygomis. Šios sistemos pagrindinis išskirtinumas toks, kad aeratorių pagalba eksponavimo talpose buvo sukurta dirbtinė vandens srovė (14 pav.). Sistemą sudarė: polietileno (PE) talpos (35 l); vandens aušintuvas, į kurį nuolatos buvo tiekiamas artezinis gręžinio vanduo (12 – 13 °C); oro kompresorius (LOW NOISE AIR PUMP LP-60); aeratoriai, į kuriuos įmontuoti deguonies akmenukai.



14 pav. Besisukančio vandens eksperimentinė sistema: **A** – vaizdas ir viršaus; **B** – vaizdas iš priekio. 1 – PE talpa; 2 – vandens aušintuvas; 3 – oro kompresorius; 4 – aeratorius; 5 – kriauklė; 6 – vandens nutekėjimas.

Stovinčio vandens sąlygomis, SM kiekiai žuvų žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse nustatyti pagal Svecevičius et al. (2014) pateiktą metodiką. Besisukančio vandens sąlygomis, SM kiekiai audiniuose nustatyti pagal 2.5. poskyryje pateiktą metodiką.

Atsižvelgiant į kiekybinius SM akumuliacijos rezultatus žuvų audiniuose, tolimesniems eksperimentiniams tyrimams buvo parinkta geriau gamtines sąlygas atitinkanti eksperimentinė sistema.

2.4.2 Optimalios ekspozicijos trukmės nustatymas

2015 m. vasario-kovo mėn. buvo vykdomas eksperimentinis tyrimas, kurio tikslas – eksperimentiškai nustatyti optimalią ekspozicijos trukmę, t. y., laiko tarpą, per kurį nusistovi metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) pusiausvyra (angl. *steady-state*) tarp vandenyje ir žuvų audiniuose esančių SM koncentracijų (Stankevičiūtė ir kt., 2017).

Optimaliai ekspozicijos trukmei SM nustatyti, naudoti *S. salar* jauniklių žiaunos, kepenys, inkstai ir raumuo.

Prieš eksperimento pradžią, po aklimacijos buvo paimti 7-ių žuvų audiniai (angl. *non-exposed control group*), ($n = 7$). Tai neeksponuota kontrolė (0). Ilgalaikių kontrolių mėginiai buvo paimti po 7, 14 ir 28 parų. Besisukančio vandens sąlygomis, bandymo žuvys buvo veikiamos 1, 2, 4, 7, 14 ir 28 paras standartiniu daigianariu SM mišiniu (MIX) (5 lentelė). Į kiekvieną 35 l PE talpą buvo suleista po 7 individus. Talpos buvo užpildytos iki 30 l nuolat aeruojamo vandens. Remiantis „3 R“ principu (Directive 2010/63/EU), šiame eksperimentiniame tyrime buvo stengiamasi sunaudoti kuo mažiau individų. Todėl šiam tyrimui pasirinkta neeksponuota kontrolė (0) ir tik 3 ilgalaikės kontrolės (7, 14 ir 28 parų).

2.4.3 Metalų kaupimosi dėsningumų tyrimas skirtingų žuvų rūšių audiniuose

Nustačius optimalią ekspozicijos SM trukmę, kitas šio darbo uždavinys buvo nustatyti metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimosi dėsningumus skirtingų žuvų rūšių žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse.

Tyrimo objektas – *S. salar*, *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* jaunikliai. Tyrimui buvo parenkami maždaug vienodo dydžio ir svorio individai. Metalų kaupimosi *S. salar* audiniuose tyrimai buvo vykdomi 2015 m. balandžio mėn., o *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* – 2016 m. lapkričio-gruodžio mėn. Metalų kaupimosi tyrimas skirtingų žuvų rūšių audiniuose buvo atliekamas besisukančio vandens sąlygomis. Šio tyrimo metu, skirtingos žuvų rūšys buvo eksponuojamos tomis pačiomis kontroliuojamomis bandymo sąlygomis.

Tyrimo metu žuvis buvo suskirstytos į 8 grupes (1 kontrolė ir 7 poveikio grupės, $n = 56$) po 7 individus į kiekvieną 35 l PE talpą, kurios buvo užpildytos iki 30 l nuolat aeruojamo vandens. Bandymo žuvis 14 parų buvo veikiamos 7 skirtingų kombinacijų daugianariais metalų mišiniais: standartiniu daugianariu SM mišiniu (MIX), kuriame visų 6 eksperimente naudojamų metalų koncentracijos atitiko DLK ir 6 skirtingais SM*0,1 (Zn*0,1; Cu*0,1; Ni*0,1; Cr*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1) mišiniais, kuriuose vieno iš 6 metalų DLK buvo sumažinta 10 kartų. Metalai ir jų bandymo koncentracijos skirtingų kombinacijų metalų mišiniuose pateikiamos 7 ir 8 lentelėje.

7 lentelė. Skirtingų kombinacijų metalų mišiniai ir SM koncentracijos (mg/l).

SM	Mišinys	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
	Šaltinis	mg/l						
Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,01	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	0,01	0,001	0,01	0,01	0,01	0,01
Ni	NiSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,001	0,01	0,01	0,01
Cr	K ₂ Cr ₂ O ₇	0,01	0,01	0,01	0,01	0,001	0,01	0,01
Pb	Pb(NO ₃) ₂	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,0005	0,005
Cd	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,0005

MIX – metalų mišinys atitinkantis DLK (Directive 2000/60/EC)

SM*0,1 – metalų mišiniai, kuriuose vieno iš metalų DLK sumažinta 10 kartų

■ – metalo DLK sumažinta 10 kartų

8 lentelė. Metalai ir jų bandymo koncentracijos skirtingų kombinacijų metalų mišiniuose (vidurkis ± standartinis nuokrypis, $n = 3$).

SM	Šaltinis	Koncentracija (mg/l)			
		MIX (DLK) nominali	MIX išmatuota	SM*0,1 nominali	SM*0,1 išmatuota
Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,115 ± 0,014	0,01	0,02 ± 0,001
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	0,009 ± 0,001	0,001	0,0018 ± 0,0003
Ni	NiSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,011 ± 0,002	0,001	< 0,002
Cr	K ₂ Cr ₂ O ₇	0,01	0,012 ± 0,002	0,001	0,0016 ± 0,0002
Pb	Pb(NO ₃) ₂	0,005	0,0045 ± 0,0004	0,0005	< 0,001
Cd	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	0,005	0,0052 ± 0,0003	0,0005	0,00042 ± 0,00003

Eksperimentiniuose metalų mišiniuose (SM*0,1) vieno iš metalų DLK buvo sumažinta 10 kartų tam, kad to metalo koncentracija mišinyje būtų artima gamtiniuose vandens telkiniuose nustatomi SM koncentracijai, ir kad išryškintų kitų SM galimas sąveikas mišinyje.

2.4.4 Metalotioneinų koncentracijos skirtingų žuvų rūšių audiniuose tyrimas

Metalotioneinų (MT) koncentracija buvo tirama (2015–2016 m.) *S. salar*, *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* jauniklių kepenyse ir inkstuose. Tyrimo metu, žuvis buvo suskirstytos į 2 grupes (1 kontrolė ir 1 poveikio grupė, $n = 14$) po 7 individus į kiekvieną 35 l PE talpą, kurios buvo užpildytos iki 30 l nuolat aeruojamo vandens. Bandymo žuvis 14 parų, besisukančio vandens sąlygomis, buvo veikiamos standartiniu daugianariu SM mišiniu (MIX). Iki MT nustatymo pradžios, išimti žuvų organai buvo laikomi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. MT koncentracija žuvų organuose buvo nustatyta Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biomokslų instituto laboratorijoje.

2.5. Metalų ir metalotioneinų koncentracijos žuvų audiniuose nustatymo metodika

Sunkiųjų metalų kiekiui nustatyti, žuvų audiniai 24 val. buvo džiovinami žemos temperatūros laboratorinėje elektros krosnyje (SNOL 60/300) $t = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po to mėginiai buvo užpilami HNO_3 (60 %) ir H_2O_2 (30 %) mišiniu (5:1 v/v) paliekami 8 val. kambario temperatūroje ir mineralizuojami mikrobangų mineralizatoriumi (BERGHOF speedwave ® two) (Jia et al., 2005). Atvėsusieji tirpalai filtruojami per $0,45\text{ }\mu\text{m}$ stiklinius filtrus ir praskiedžiami dejonizuotu vandeniu. Sunkiųjų metalų koncentracija paruoštuose tirpaluose, buvo nustatyta sertifikuotoje laboratorijoje atominės absorbcijos spektrofotometru (AAS) Varian Spectr AA 55 (USA), naudojant grafitinę krosnį (ISO 15586:2003). Nustačius SM koncentracijas tirpale, apskaičiuojama metalų koncentracija sausame ir šlapiame audinio svoryje. Galutinė SM koncentracija audinyje buvo išreiškiama mg/kg šlapio svorio:

$$C_{\xi} = \frac{m_s}{m_{\xi}} \cdot C_s, \text{ mg/kg} \quad (2.3)$$

kur m_s – sauso mėginio masė, kg; m_{ξ} – šlapio mėginio masė, kg; C_s – metalo koncentracija sausame audinyje, mg/kg; C_{ξ} – metalo koncentracija šlapiame audinyje, mg/kg.

Sunkiųjų metalų nustatymo tikslumas buvo įvertintas naudojant sertifikuotą referentinę medžiagą „Fish homogenate“ (IAEA-407). Išmatuotų verčių ribos neviršijo 10 % sertifikuotų verčių.

Metalotioneinų koncentracija žuvų organuose buvo nustatyta remiantis Peixoto et al. (2003) ir Riener et al. (2002) tyrimo metodikomis. Žuvų organai buvo suardomi rankiniu homogenizatoriumi „Potter-Elvehjem“ (Sigma-Aldrich), užpylus 4 tūrius (atsižvelgiant į organo svorį) homogenizavimo buferio (20 mM Tris (hidroksimetil) aminometano-HCl, pH 8,6 turinčio 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido 0,01 % β -merkaptoetanolio). Audiniai buvo ardomi 3 min. Homogenatas centrifuguojamas 17000 x g, 30 min., 4 °C. Po centrifugavimo, nustatomas MT kiekis supernatante. Į 1 ml supernatanto įpilama 1,05 ml absoliutaus etanolio (-20 °C) ir 80 μ l chloroformo. Centrifuguojama 6000 x g, 10 min., 4 °C. Į gautą supernatantą įpilami 3 tūriai etanolio (-20 °C) ir laikoma 1 val. -20 °C šaldiklyje. Centrifuguojama 6000 x g, 10 min., 4 °C. Gautos nuosėdos (kuriuose yra MT) praplaunamos 1 ml 87 % etanolio ir 1 % chloroformo mišiniu. Centrifuguojama 6000 x g, 10 min., 4 °C. MT kiekis nustatomas kolorimetriniu būdu naudojant Elmano reagentą. Po centrifugavimo gautos nuosėdos suspenduojamos 150 μ l 0,25 M NaCl ir įpilama 150 μ l 1 N HCl tirpalo, turinčio 4 mM etilendiamintetraacetato. Įpilama 4,2 ml 0,2 M natrio fosfato buferio, pH 8,0, turinčio 2 M NaCl ir 0,43 mM DTNB (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoinė rūgštis). Centrifuguojama 3000 x g, 5 min., kambario temperatūroje. Matuojama 412 nm bangos ilgio šviesos sugerties supernatante. Molinis sugerties koeficientas – 14140 M⁻¹cm⁻¹ (Eyer et al., 2003). MT kiekis išreiškiamas merkaptogrūpių – SH kiekiu μ g/g šlapio organo svorio.

2.6. Statistinė analizė

Visi gauti tyrimo rezultatai buvo apdorojami statistiškai, naudojant programą STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Kintamųjų skirstinių normalumas buvo tikrinamas Kolmogorov-Smirnov ir Shapiro-Wilk testais ($p > 0,05$).

Sunkiųjų metalų koncentracijos Kairių sąvartyno žuvų ir lašišų iš Vilnios ir Siesarties upių audiniuose analizuotos dvifaktoriaus daugiamate dispersine analize (MANOVA). Daugybiniams koncentracijų palyginimams atlikti naudojant aposteriorinį (post-hoc) daugkartinio lyginimo Bonferonio (Bonferroni) kriterijų. Lašišų skirtingose upėse būklės somatiniai rodikliai palyginti vienfaktoriaus dispersine analize (ANOVA).

Optimalios ekspozicijos trukmės (laiko būtino nusistovėti Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd koncentracijoms audiniuose) nustatymui duomenys analizuoti vienfaktoriaus ANOVA (faktorius – ekspozicijos trukmė) ir daugybinio palyginimo post-hoc Bonferroni testu. Ekspozicijos laikas nuo kurio SM koncentracija toliau reikšmingai nedidėjo vertintas kaip optimali ekspozicijos trukmė. Metalų kiekio audiniuose priklausomybė nuo ekspozicijos laiko taip pat aproksimuota trijų parametrų logistiniu modeliu panaudojant programą CurveExpert Professional 2.6.3.

Metalų Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd kaupimo lašišų, kuojų ir ešerių audiniuose veikiant juos daugianariais šių metalų mišiniais dėsningumai analizuoti dvifaktoriaus ANOVA ir aposterioriniu daugybinių palyginimų Bonferroni kriterijumi.

Metalotioneinių (MT) koncentracijos skirtumai kontrolės ir poveikio žuvų kepenyse ir inkstuose vertinti naudojant vienfaktoriaus dispersinę analizę. Ryšys tarp MT ir SM kiekių skirtingų žuvų rūšių audiniuose nustatytas naudojant Pearson'o koreliacijos koeficientą.

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Metalų kaupimosi gamtinėje aplinkoje gyvenančiose žuvyse tyrimas

3.1.1 Metalų kaupimasis Kairių sąvartyno hidroekosistemoje gyvenančių žuvų audiniuose

Sunkiųjų metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekis nustatytas *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* žiaunose, kepenyse ir raumenyse, šešiose Kairių hidroekosistemos vietose. SM koncentracijų audiniuose nustatymui buvo atrinkti panašaus ilgio ir svorio individai (9 lentelė).

9 lentelė. Kairių sąvartyno hidroekosistemoje surinktų *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* ilgiai ir svoriai (vidurkis \pm standartinė paklaida).

Parametras	Žuvų rūšis	
	<i>P. fluviatilis</i>	<i>R. rutilus</i>
Bendras ilgis (<i>L</i>), mm	257,8 \pm 14,4	262,1 \pm 13,4
Standartinis ilgis (<i>l</i>), mm	232,8 \pm 13,0	226,5 \pm 11,4
Bendras svoris (<i>Q</i>), g	326,8 \pm 39,4	329,8 \pm 31,4
Svoris be vidaus organų (<i>q</i>), g	297,2 \pm 36,0	291,9 \pm 28,2
Individų skaičius (<i>n</i>)	32	34

Kairių sąvartyno hidroekosistemos vandens fizikinių-cheminių rodiklių vertės, išmatuotos skirtingu atstumu nuo taršos šaltinio (žr. 2.3.1 poskyrį; 12 pav.), pateiktos 10 ir 11 lentelėje. Visose matavimo stotyse Zn, Pb ir Cd koncentracija vandenyje buvo žemiau prietaiso aptikimo ribos. Nuo taršos šaltinio toliau esančiose stotyse (2-5 stotys) Cu, Ni ir Cr koncentracija vandenyje taip pat buvo žemiau prietaiso aptikimo ribos (11 lentelė).

10 lentelė. Vandens fizikiniai-cheminiai rodikliai, išmatuoti Kairių sąvartyno hidroekosistemos mėginių surinkimo stotyse [*n* (matavimo stotys) = 6].

Parametras ⁽¹⁾	Vidurkis	Ribos
Temperatūra*, °C	16,0	(8,30–22,9)
pH*	7,85	(6,78–8,45)
Ištirpęs O ₂ *, mg O ₂ /l	7,68	(2,42–11,6)
Savitasis elektrinis laidis*, μS/cm	783,5	(615,0–1355,0)
Bendras kietumas, pagal CaCO ₃ , mg/l	351,7	(308–438)
HCO ₃ ⁻ , mg/l	308,8	(256–440)
CO ₃ ²⁻ , mg/l	0,41	(0,14–0,66)
NO ₂ ⁻ , mg/l	0,08	(0,00–0,46)
NO ₃ ⁻ , mg/l	3,61	(0,00–7,61)
SO ₄ ²⁻ , mg/l	57,3	(51,1–77,6)
Cl ⁻ , mg/l	73,2	(52,6–172,0)

10 lentelės tęsinys

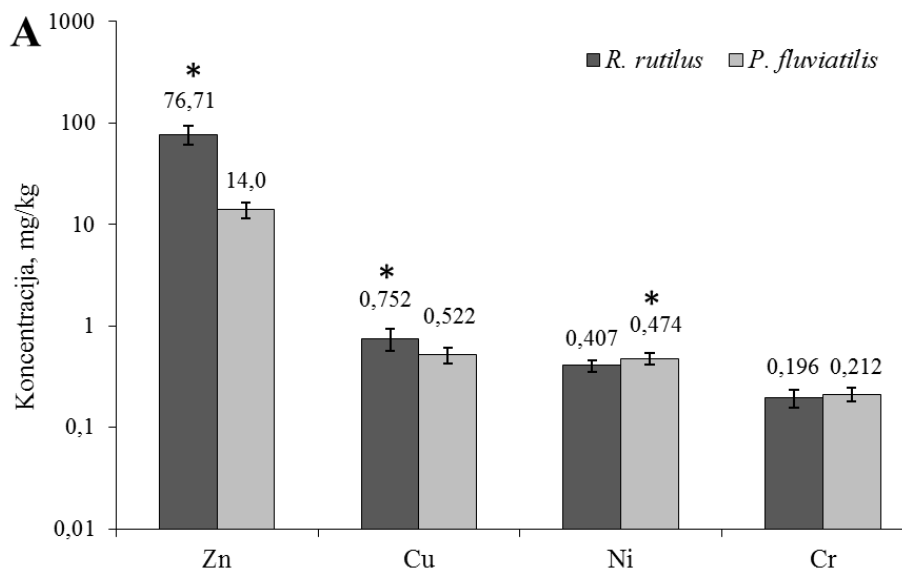
Ca ²⁺ , mg/l	97,4	(79,6–135,0)
Mg ²⁺ , mg/l	26,4	(24,6–28,7)
Na ⁺ , mg/l	37,6	(25,2–93,2)
K ⁺ , mg/l	5,00	(3,20–11,4)
NH ₄ ⁺ -N, mg/l	1,16	(0,077–5,73)

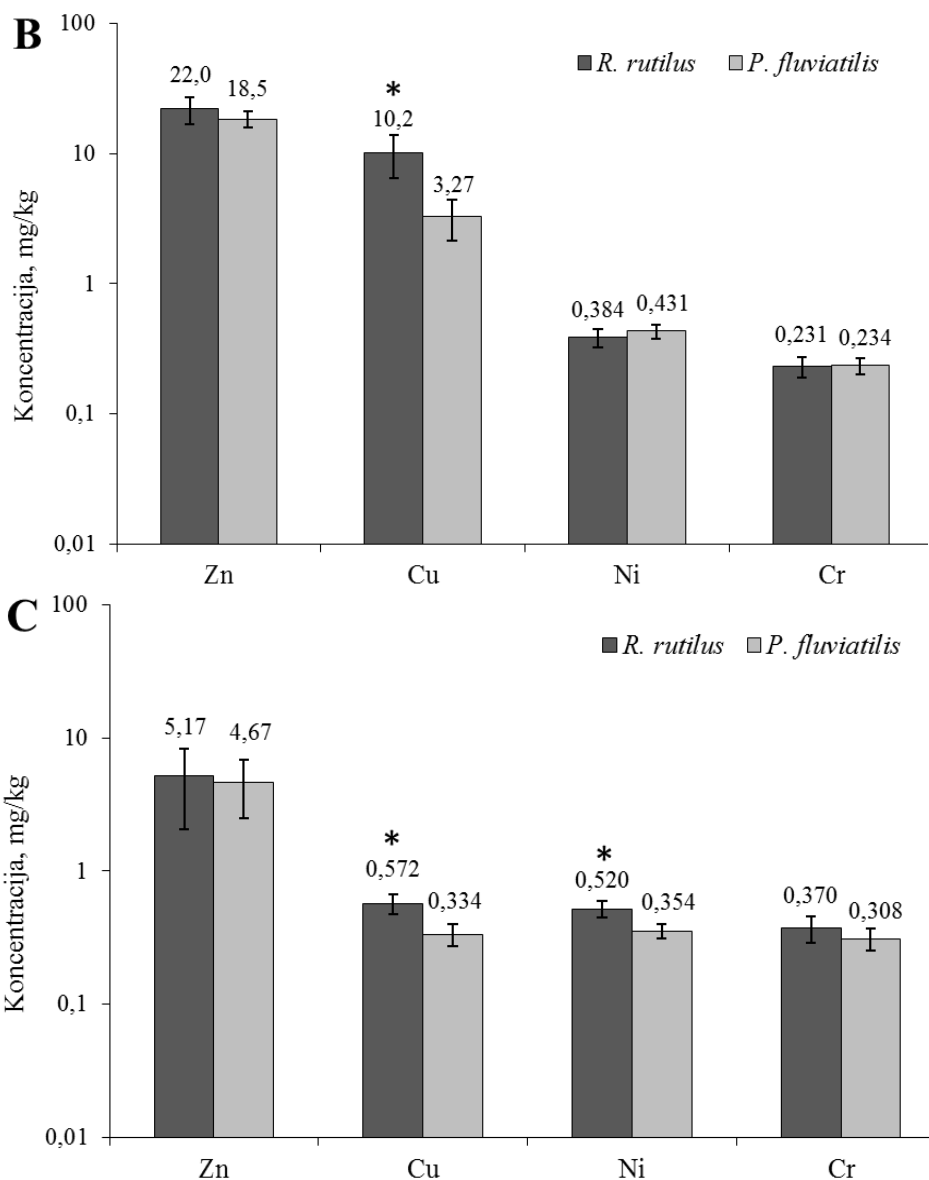
¹žvaigždute (*) pažymėti rodikliai, matuoti kartą per sezoną (pavasaris-vasara-ruduo), likę rodikliai – kartą per metus.

11 lentelė. Metalų koncentracija (µg/l) vandenyje Kairių sąvartyno hidroekosistemos mėginių surinkimo stotyse.

Stotis	Zn	Cu	Ni	Cr	Pb	Cd
	µg/l					
Nr. 0	< 40,0	1,0	4,0	4,0	< 1,0	< 0,3
Nr. 1	< 40,0	2,0	2,0	2,0	< 1,0	< 0,3
Nr. 2	< 40,0	< 1,0	< 2,0	< 1,0	< 1,0	< 0,3
Nr. 3	< 40,0	< 1,0	< 2,0	< 1,0	< 1,0	< 0,3
Nr. 4	< 40,0	< 1,0	< 2,0	< 1,0	< 1,0	< 0,3
Nr. 5	< 40,0	< 1,0	< 2,0	< 1,0	< 1,0	< 0,3

Sugautų *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* žiaunose, kepenyse ir raumenyse buvo nustatyti Zn, Cu, Ni ir Cr kiekiai. Švino ir Cd kiekis mėginiuose buvo žemiau prietaiso aptikimo ribos (< 1,0; < 0,3 µg/l, atitinkamai). Žuvų audiniuose daugiausiai aptikta Zn, mažiausiai – Cr (15 pav.).





15 pav. Metalų kiekis Kairių sąvartyno hidroekosistemoje gyvenančių *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* audiniuose: žiaunose (A), kepenyse (B), raumenyse (C). [Vidurkis ± standartinis nuokrypis, n (mėginių sk.) = 11]. Žvaigždutė (*) žymi reikšmingus skirtumus tarp skirtingos rūšies žuvų verčių (dvifaktoriinė MANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,005$). Y ašyje metalų koncentracijos pateiktos logaritminėje skalėje.

Metalų kaupimasis žuvyse skyrėsi priklausomai nuo žuvų rūšies ir audinio. Daugumos SM kiekiai visaėdės kuojos audiniuose buvo didesni nei gyvūninės kilmės maistu mįtančio ešerio audiniuose. *R. rutilus* SM labiau kaupė žiaunose, *P. fluviatilis* – kepenyse. Žuvų raumenyse SM kiekiai buvo mažiausi. Kuojos 5,5 karto daugiau kaupė Zn žiaunose ir 3 kartus daugiau Cu kepenyse nei ešeriai. Tiek kuojos, tiek ešeriai Cr (visuose audiniuose), Zn

(kepenyse ir raumenyse) ir Ni (kepenyse) kaupė panašiai ir skirtumų neparodė (post-hoc Bonferroni testai, $p > 0,05$).

3.1.2 Metalų kaupimasis Vilnios ir Siesarties upių lašišų audiniuose

Tyrimo metu nustatytas Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd kiekis *S. salar* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse. Vilnios ir Siesarties upių bendrieji hidrocheminiai rodikliai buvo gana panašūs, reikšmingų skirtumų tarp verčių nenustatyta (vienfaktorinė ANOVA, upės efektas, $p > 0,05$) (12 lentelė).

12 lentelė. Vidutiniai metiniai upių vandens fizikiniai-cheminiai rodikliai matuoti kartą per sezoną (žiema-pavasari-vasarą-rudenį) 2013 m. [vidurkis (ribos), $n = 4$].

Parametrai	Vilnia žemiau Vilnios	Naujosios Vilnios	Siesarties žemupyje	
Temperatūra, °C	9,75	(0,3–17,5)	10,9	(1,3–11,9)
pH	7,92	(7,61–8,18)	8,06	(7,82–8,32)
Ištirpęs O ₂ , mg O ₂ /l	9,62	(8,4–11,15)	11,4	(9,92–12,3)
Prisotinimas O ₂ , %	85,8	(57,8–102,3)	103,9	(78,8–137,3)
Savitasis elektrinis laidis, μS/cm	414,3	(399–445)	476,0	(415–530)
BDS ₇ , mg O ₂ /l	2,13	(1,3–2,7)	1,85	(1,2–2,6)
Bichromatinė oksidacija, mg O ₂ /l	20,3	(19–22)	32,3	(19–50)
Bendra organinė anglis, mg/l	9,0	(8,6–10,7)	14,1	(7,09–20,4)
Šarmingumas, mg-ekv/l	3,5	(3–4)	4,5	(3–5)
NH ₄ ⁺ -N, mg N/l	0,06	(0,022–0,153)	0,05	(0,005–0,148)
NO ₂ ⁻ -N, mg N/l	0,03	(0,012–0,077)	0,01	(0,005–0,025)
NO ₃ ⁻ -N, mg N/l	0,9	(0,633–1,23)	1,81	(0,276–4,24)
Bendras azotas, mg/l	1,25	(0,835–1,81)	2,95	(0,36–7,51)
PO ₄ ³⁻ -P, mg P/l	0,05	(0,036–0,053)	0,03	(0,013–0,045)
Bendras fosforas, mg/l	0,11	(0,057–0,16)	0,14	(0,064–0,342)

Pastaba: duomenys gauti iš Lietuvos Respublikos Aplinkos Ministerijos Vilniaus regiono aplinkos apsaugos departamento.

Metalų koncentracija upių vandenyje, mėginių surinkimo vietose, buvo skirtinga. Vilnios upės vandenyje Cu, Ni, Cr ir Pb koncentracija buvo reikšmingai aukštesnė, lyginant su Siesarties upe, tačiau DLK neviršijo (13 lentelė). Minėtų SM koncentracija Vilnios upės vandenyje buvo nuo 2 iki 4 kartų aukštesnė nei Siesarties upėje.

13 lentelė. Metalų koncentracija ($\mu\text{g/l}$) upių vandenyje (vidurkis \pm standartinis nuokrypis, $n = 3$).

Upė	Sunkieji metalai					
	Zn	Cu	Ni	Cr	Pb	Cd
Vilnia	38,5 \pm 7,3	3,6 \pm 0,49*	1,5 \pm 0,21*	3,6 \pm 0,56*	1,9 \pm 0,34*	0,063 \pm 0,015
Siesartis	27,8 \pm 5,8	1,9 \pm 0,30	0,43 \pm 0,05	0,74 \pm 0,11	0,79 \pm 0,15	0,037 \pm 0,007
DLK	100	10	10	10	5	5

Pastaba: žvaigždutė (*) žymi reikšmingus koncentracijų skirtumus tarp upių (vienfaktorinė ANOVA, upės efektas, $p < 0,05$). DLK – didžiausia leistina koncentracija reglamentuota ES vidaus vandenims (2000/60/EC).

Vilnios ir Siesarties upėse sužvejotos *S. salar* reikšmingai skyrėsi pagal morfometrinius (L , l_c , Q , q) (vienfaktorinė ANOVA); upės efektas: $F_{1,72} = 133,1$; $p < 0,0001$) ir morfologinius rodiklius (IK , $\check{Z}SI$, KSI , ISI , VSI) (vienfaktorinė ANOVA; upės efektas: $F_{1,90} = 5,82$; $p = 0,018$). Taip pat reikšmingi skirtumai nustatyti ir tarp atskirų rodiklių verčių (14 lentelė).

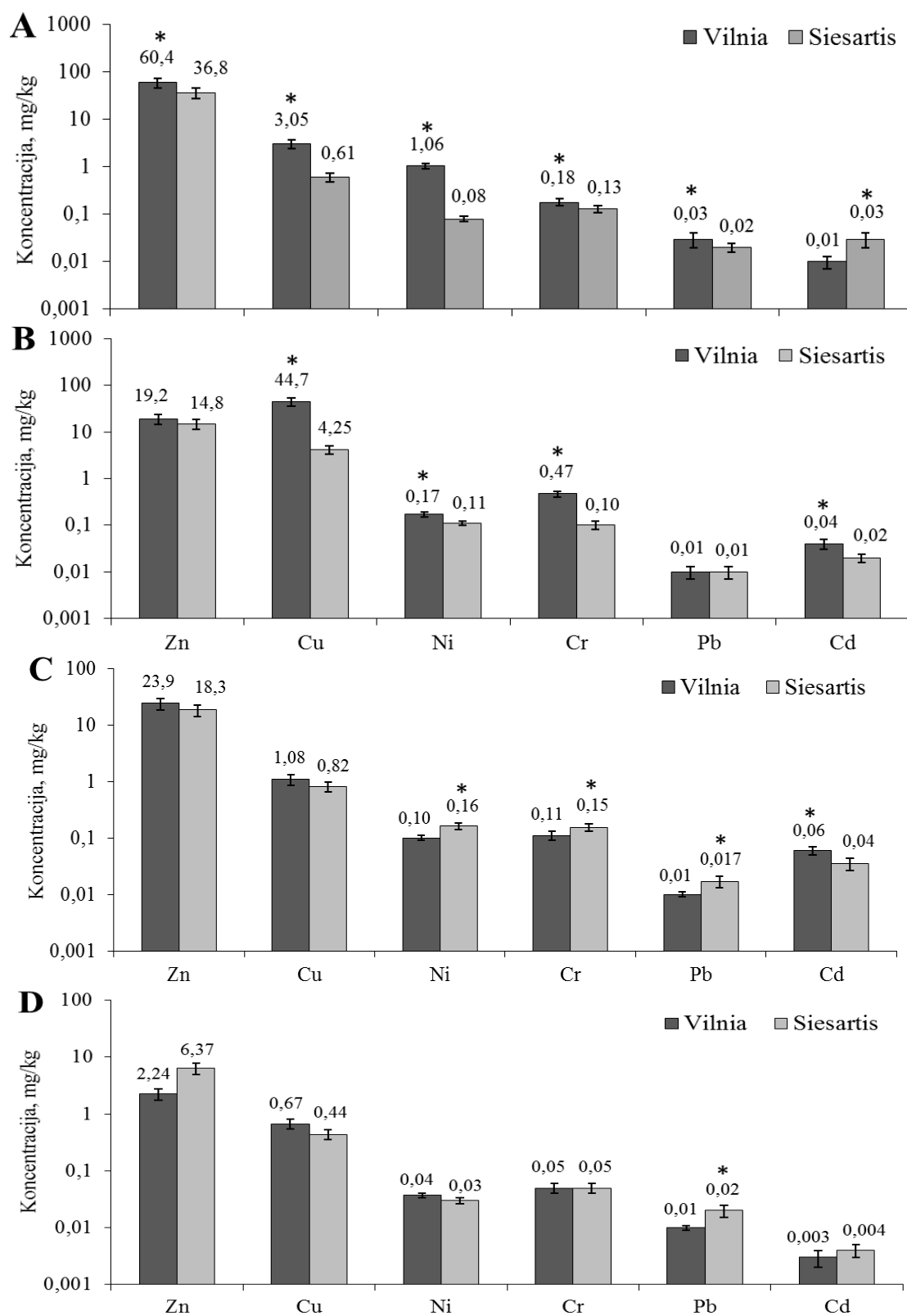
14 lentelė. Vilnios ir Siesarties upių *S. salar* morfometrinių ir morfologinių rodiklių vertės (vidurkis \pm standartinis nuokrypis, $n = 10$).

Parametras	Upė		p
	Vilnia	Siesartis	
	Morfometriniai rodikliai		
Bendras ilgis (L), mm	177,5 \pm 2,7*	127,5 \pm 8,1	< 0,0001
Kaudalinis ilgis (l_c), mm	168,3 \pm 2,4*	119,8 \pm 7,6	< 0,0001
Bendras svoris (Q), g	50,1 \pm 2,4*	22,5 \pm 3,7	< 0,0001
Svoris be vidaus organų (q), g	43,6 \pm 2,2*	18,9 \pm 3,2	< 0,0001
	Morfologiniai rodikliai		
Įmitimo koeficientas (IK)	1,05 \pm 0,07*	1,20 \pm 0,07	0,0023
Žiaunų somatinis indeksas ($\check{Z}SI$)	3,08 \pm 0,25*	2,52 \pm 0,58	0,011
Kepenų somatinis indeksas (KSI)	1,02 \pm 0,19	1,03 \pm 0,17	0,942
Inkstų somatinis indeksas (ISI)	0,90 \pm 0,15	0,79 \pm 0,11	0,066
Visceralinis somatinis indeksas (VSI)	13,1 \pm 1,78*	17,4 \pm 4,59	0,013

Pastaba: žvaigždutė (*) žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių (vienfaktorinė ANOVA, upės efektas, $p < 0,05$).

Siesarties upėje to paties amžiaus *S. salar* individai buvo smulkesni, mažesnis jų vidutinis kūno svoris ir ilgis nei Vilnios upėje. Tačiau analizuojant Vilnios ir Siesarties upių *S. salar* morfologinius rodiklius matyti, kad žuvų IK ir VSI vertės Siesarties upėje reikšmingai didesnės ($IK = 1,20 \pm 0,07$; $VSI = 17,4 \pm 4,59$) nei Vilnios upėje. Šie rodikliai atspindi bendrą žuvų gerbūvį supančioje aplinkoje (angl. *well-being*) (Van der Oost et al., 2003).

Metalų bioakumuliacijos tyrimų *S. salar* audiniuose rezultatai pateikiami 16 paveiksle.



16 pav. Metalų kiekis Vilnios ir Siesarties upių *S. salar* audiniuose: žiaunose (A), kepenyse (B), inkstuose (C), raumenyse (D). (Vidurkis ± standartinis nuokrypis, $n = 10$). Žvaigždutė (*) žymi reikšmingus koncentracijų skirtumus (dvifaktoriinė MANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$). Y ašyje metalų koncentracija pateikta logaritminėje skalėje.

Daugeliu atvejų (10 iš 15), metalų kiekis Vilnios lašišų audiniuose buvo reikšmingai didesnis lyginant su lašišomis, sugautomis Siesarties upėje. Vilnios upės *S. salar* žiaunose Ni koncentracija buvo net 13,3 karto, o Cu koncentracija kepenyse – 10,4 karto didesnė nei atitinkamuose Siesarties lašišų audiniuose. Siesarties upės lašišos reikšmingai daugiau kaupė tik Pb inkstuose ir raumenyse, Ni ir Cr inkstuose bei Cd žiaunose. Abiejose upėse metalai labiausiai kaupėsi *S. salar* žiaunose ir kepenyse, mažiausiai – raumenyse. Žuvų audiniuose daugiausiai kaupėsi Zn, mažiausiai – Pb ir Cd. Tačiau nustatyti SM kiekiai žuvų audiniuose neviršijo nustatytų standartų (EC 2014, 2015).

3.1.3 Rezultatų aptarimas

Nors sukaupta nemažai duomenų apie SM kaupimąsi žuvų audiniuose iš gamtinių vandens telkinių, tačiau žuvų tarprūšiniai skirtumai, kurie gali turėti įtakos SM kaupimuisi, vis dar lieka ištirti nepakankamai. Daugelis gamtinių ir eksperimentinių tyrimų įrodė, kad SM kaupimasis žuvų audiniuose priklauso nuo SM cheminės prigimties, SM biologinio įsisavinamumo, nuo kitų metalų buvimo vandenyje, vandens fizikinių-cheminių rodiklių, žuvų rūšiai būdingų specifinių ekologinių, elgsenos, organizmo biocheminių bei fiziologinių savybių (Clearwater et al., 2002; Atli and Canli, 2003; Jezierska and Witeska, 2006; Luczynska and Tonska, 2006; Karthikeyan et al., 2007; Madenjian et al., 2014; Merciai et al., 2014; Yancheva et al., 2014).

Upių tyrimo metu, daugeliu atvejų (10 iš 15), SM kiekis Vilnios *S. salar* audiniuose buvo reikšmingai didesnis lyginant su lašišomis sugautomis Siesarties upėje. Tai galėjo lemti reikšmingai aukštesnę SM koncentraciją (vidutiniškai 2,6 kartus) Vilnios upės vandenyje nei Siesartyje. Be to, galimą taršą Vilnios upėje indikavo ir žuvų jautriausi morfologiniai rodikliai: įmitimo koeficientas (*IK*), žiaunų (*ŽSI*) ir visceralinis (*VSI*) somatiniai indeksai. Vilnios upės lašišų *IK* vertė buvo reikšmingai žemesnė (*IK* = 1,05) lyginant su Siesarties lašišomis (*IK* = 1,20). Šie tyrimo rezultatai sutapo ir su kitų autorių darbais, kurių metu buvo nustatyta žemesnė žuvų *IK* vertė metalais užterštoje aplinkoje (Miller et al., 1992; Eastwood and Couture, 2002). Lyginant Vilnios

ir Siesarties upių lašišų *ŽSI* matyti, kad Vilnios upėje gyvenančių žuvų žiaunų somatinis indeksas ($\bar{ZSI} = 3,08$) buvo reikšmingai aukštesnis nei Siesarties žuvų ($\bar{ZSI} = 2,52$). Paprastai, esant prastai vandens kokybei, žuvų *IK*, *VSI* vertės linkusios sumažėti, lyginant su švarios aplinkos žuvimis, dėl galimai padidėjusios apkrovos organams (Dethloff and Schmitt, 2000; Barnes et al., 2012). Žiaunos, priešingai, užterštoje aplinkoje linkusios padidėti (hipertrofuotis) dėl žiaunų epitelinio audinio pakitimų – hiperplazijos (Pawert et al., 1998; Georgieva et al., 2014).

Skirtingų žuvų rūšių audiniai labiausiai kaupė būtinuosius metalus (Zn, Cu), mažiausiai – toksiškus metalus (Pb, Cd). Tam įtakos gali turėti organizmo prisitaikymas labiau šalinti toksiškus metalus nei būtinuosius (Roy 2010). Tyrimo rezultatai atitinka metalų skirstymo į būtinuosius (Zn, Cu), nebūtinuosius netoksiškus (Ni, Cr) ir nebūtinuosius toksiškus (Pb, Cd) koncepciją (Roy 2010). Tyrimo metu buvo nustatyti tokio paties pobūdžio SM kaupimosi dėsningumai skirtingų žuvų audiniuose, skirtingų rūšių žuvyse paimtų iš skirtingų hidroekosistemų. Metalų kiekybinės kaupimosi sekos žuvų audiniuose pateikiamos 15-oje lentelėje.

15 lentelė. Metalų kiekybinės kaupimosi sekos skirtingų žuvų rūšių audiniuose.

Audinys	Upių tyrimas (<i>S. salar</i>)	Kairių sąvartyno hidroekosistemos tyrimas
Žiaunos	Vilnia Zn > Cu > Ni > Cr > Pb > Cd	<i>R. rutilus</i> Zn > Cu > Ni > Cr > Pb = Cd*
	Siesartis Zn > Cu > Cr > Ni > Cd > Pb	<i>P. fluviatilis</i> Zn > Cu > Ni > Cr > Pb = Cd*
Kepenyys	Vilnia Cu > Zn > Cr > Ni > Cd > Pb	<i>R. rutilus</i> Zn > Cu > Ni > Cr > Pb = Cd*
	Siesartis Zn > Cu > Ni > Cr > Cd > Pb	<i>P. fluviatilis</i> Zn > Cu > Ni > Cr > Pb = Cd*
Raumenys	Vilnia Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd	<i>R. rutilus</i> Zn > Cu > Ni > Cr > Pb = Cd*
	Siesartis Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd	<i>P. fluviatilis</i> Zn > Ni > Cu > Cr > Pb = Cd*
Inkstai	Vilnia Zn > Cu > Cr > Ni > Cd > Pb	–
	Siesartis Zn > Cu > Ni > Cr > Cd > Pb	–

Pastaba: *Pb ir Cd kiekis mėginiuose buvo žemiau prietaiso aptikimo ribos (< 1,0 ir < 0,3 µg/l, atitinkamai).

Remiantis gamtinio tyrimo rezultatais, metalai labiausiai linkę kauptis *S. salar*, *R. rutilus* žiaunose, o *P. fluviatilis* – kepenyse. Tam įtakos galėjo turėti tai, kad šie žuvų audiniai labiausiai kaupia metalus (Kroglund et al., 2008; Heier et al., 2009; Nunes et al., 2015). Žiaunos – biotinis ligandas, kuris tiesiogiai kontaktuoja su išorine aplinka ir geba efektyviau absorbuoti metalų jonus (Teien et al., 2006; Playle 2004). Kepenyse metalai detoksikuojami, jų

perteklius dažnai kaupiamas, o po to per inkstus pašalinamas iš organizmo (Karadede et al., 2004). Mažiausi metalų kiekiai nustatyti visų tirtų rūšių žuvų raumenyse. Daugelis gamtinių ir eksperimentinių tyrimų įrodė, kad žuvų raumenyse SM kaupiasi mažiausiai dėl mažo baltymų, kurie geba surišti metalų jonus, kiekio. Nepaisant to, šis audinys yra įtrauktas į daugelio šalių stebėjimo ir rizikos vertinimo programas dėl jo svarbos žmogaus mitybai (Guérin et al., 2011; Merciai et al., 2014).

3.2. Metalų kaupimasis žuvų audiniuose eksperimentinėmis sąlygomis

3.2.1 Eksperimentinės sistemos parinkimas

Išanalizavus gamtinio tyrimo SM kaupimosi rezultatus *S. salar* audiniuose, pirmiausia eksperimentinis tyrimas buvo vykdomas *stovinčio* vandens (Svecevičius ir kt., 2014), po to – *besisukančio* vandens sąlygomis su dirbtinai išveistais *S. salar* jaunikliais. Gamtinio ir eksperimentinio SM kaupimosi *S. salar* audiniuose tyrimo rezultatai pateikti 16 lentelėje.

Tomis pačiomis kontroliuojamomis bandymo sąlygomis, *S. salar* jaunikliai 14 parų buvo eksponuojami standartiniame daugianariame SM mišinyje (MIX). Tiek gamtinėmis sąlygomis, tiek eksperimento besisukančiame vandenyje metu, metalai mažiausiai kaupėsi raumenyse (16 lentelė). Vienintelė išimtis – Pb, kuris labiausiai kaupėsi *S. salar* raumenyse tiek gamtinio, tiek *stovinčio* vandens, tiek besisukančio vandens sąlygomis. Manoma, dėl šio metalo lėtesnio pašalinimo iš raumeninio audinio (Yousafzai et al., 2010).

Tyrimo rezultatai parodė, kad besisukančio vandens sąlygomis, metalų kaupimosi žuvų audiniuose dėsningumai yra artimi dėsningumams, nustatytiems gamtinio tyrimo metu bei sutampa su kitų autorių tyrimo rezultatais (Jeziarska and Witeska, 2001; Yancheva 2010; Yousafzai et al., 2010). Tuo tarpu eksperimentinio tyrimo *stovinčio* vandens sąlygomis rezultatai buvo priešingi gamtinio tyrimo rezultatams. Žuvis didžiausius metalų kiekius sukaupe raumenyse (žr. 16 lentelę; išryškinta raudonai).

16 lentelė. Vidutiniai SM kiekiai (mg/kg) *S. salar* audiniuose gamtinėmis sąlygomis ir veikiant mišiniu MIX (Ž – žiaunos; K – kepenys; I – inkstai; R – raumenys).

SM	Gamtinis tyrimas, <i>n</i> (individų sk.) = 10	Stovintis vanduo, <i>n</i> (individų sk.) = 7	Besisukantis vanduo, <i>n</i> (individų sk.) = 7
Zn	Vilnia: 60,4 > 23,9 > 19,2 > 2,24 Ž > I > K > R Siesartis: 36,8 > 18,3 > 14,8 > 6,37 Ž > I > K > R	28,3 > 4,89 > 3,42 > 1,89 R > Ž > I > K	36,0 > 31,3 > 29,4 > 2,69 Ž > K > I > R
Cu	Vilnia: 44,7 > 3,05 > 1,08 > 0,67 K > Ž > I > R Siesartis: 4,25 > 0,820 > 0,610 > 0,440 K > I > Ž > R	0,354 > 0,287 > 0,235 > 0,224 R > K > I > Ž	5,94 > 1,77 > 0,799 > 0,708 K > I > Ž > R
Ni	Vilnia: 1,06 > 0,170 > 0,100 > 0,037 Ž > K > I > R Siesartis: 0,164 > 0,110 > 0,080 > 0,030 I > K > Ž > R	0,751 > 0,562 > 0,143 > 0,081 R > Ž > K > I	0,089 > 0,085 > 0,049 > 0,038 Ž > I > K > R
Cr	Vilnia: 0,470 > 0,180 > 0,110 > 0,050 K > Ž > I > R Siesartis: 0,153 > 0,130 > 0,100 > 0,050 I > Ž > K > R	0,280 > 0,135 > 0,125 > 0,039 R > K > I > Ž	0,569 > 0,287 > 0,130 > 0,046 Ž > I > K > R
Pb	Vilnia: 0,030 > 0,010 = 0,010 = 0,010 Ž > K = I = R Siesartis: 0,020 = 0,020 > 0,017 > 0,010 Ž = R > I > K	0,413 > 0,255 > 0,237 > 0,189 R > K > Ž > I	0,054 > 0,044 > 0,028 > 0,015 R > Ž > I > K
Cd	Vilnia: 0,060 > 0,040 > 0,010 > 0,003 I > K > Ž > R Siesartis: 0,035 > 0,030 > 0,020 > 0,004 I > Ž > K > R	0,041 > 0,034 > 0,032 > 0,020 K > R > Ž > I	0,503 > 0,243 > 0,154 > 0,004 Ž > I > K > R

Kiek yra žinoma, raumenys nėra linkę kaupti metalus, dėl mažo metalus surišančių baltymų (pvz., MT) kiekio (Yancheva et al., 2014; Jezierska and Witeska, 2001). Todėl tikėtina, kad eksperimentinės sistemos su stovinčiu vandeniu nėra tinkamos SM kaupimosi žuvyse tyrimams. Rezultatus galėjo nulemti *S. salar* elgsena bandymo metu. Kai žuvis buvo perkeliama į 30 l bandymo akvariumus po 7 individus, jos pasiskirstydavo akvariumo kampuose ir tiesiog „gulėdavo“ ant dugno. Žuvų aktyvumas ekspozicijos laikotarpiu buvo labai mažas. Tuo tarpu yra žinoma, kad Atlantinė lašiša yra reofilinė žuvis, jos jaunikliams, gyvenantiems tik tekančiame vandenyje, būdinga reoreakcija (angl. *rheotaxis*). Gamtinėje aplinkoje *S. salar*, kaip ir daugelio kitų rūšių žuvis, aktyviai ieško maisto bei migruoja trumpesniais ar ilgesniais atstumais. Esant didesniai žuvų aktyvumui, metalai labiau linkę kauptis audiniuose, kuriuose vyksta metaboliniai procesai (kepenyse, inkstuose, žiaunose) (Chovanec et al., 2003; Yancheva et al., 2014), ką ir patvirtino šio gamtinio

tyrimo bei eksperimentinio tyrimo besisukančio vandens sąlygomis rezultatai. Todėl tolimesniems eksperimentiniams tyrimams buvo parinkta labiau gamtines sąlygas atitinkanti – besisukančio vandens eksperimentinė sistema.

3.2.2 Optimalios ekspozicijos trukmės nustatymas

Šio tyrimo metu buvo siekiama eksperimentiškai nustatyti optimalią ekspozicijos trukmę, t. y., laiką, kuriam praėjus metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) koncentracijų didėjimas *S. salar* audiniuose tampa nebereikšmingu.

Besisukančio vandens sąlygomis, bandymo žuvys buvo eksponuojamos 1, 2, 4, 7, 14 ir 28 paras standartiniu daugianariu SM mišiniu (MIX) (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd). Šiam eksperimentiniam tyrimui, kontrolei ir poveikio grupėms, buvo parinkti panašaus ilgio ir svorio individai (17 lentelė).

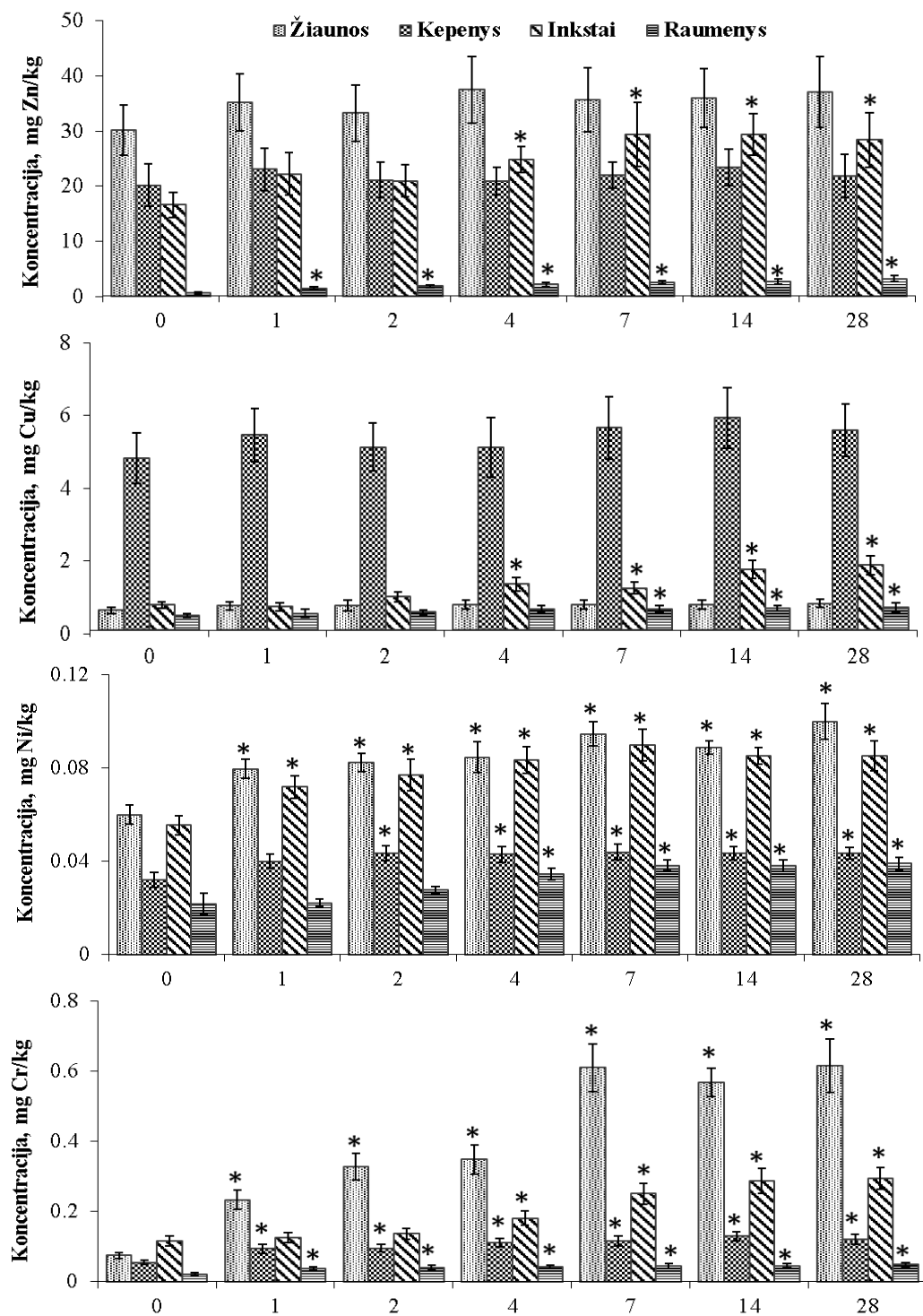
17 lentelė. Kontrolės ir poveikio grupių *S. salar* morfometriniai parametrai (vidurkis ± standartinis nuokrypis).

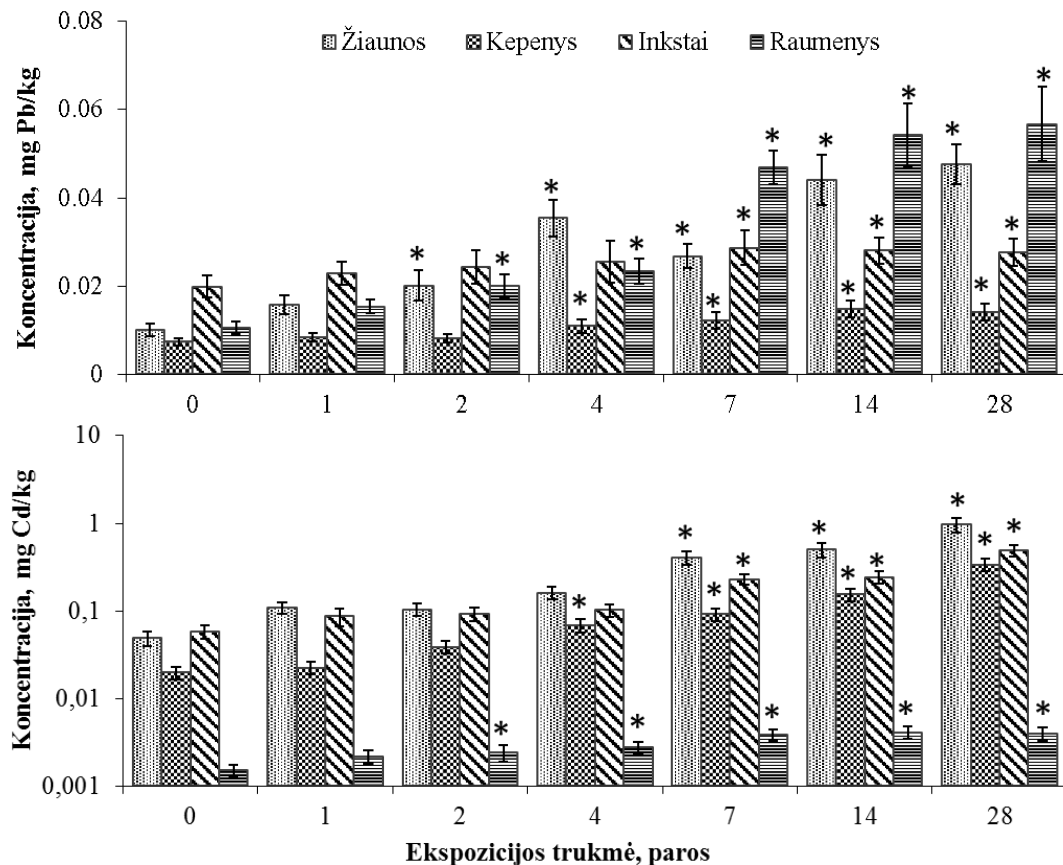
Parametras	Kontrolė	Bandymas
Bendras ilgis (<i>L</i>), mm	171,7 ± 10,4	170,6 ± 8,64
Kaudalinis ilgis (<i>l_c</i>), mm	162,5 ± 9,66	161,9 ± 8,40
Bendras svoris (<i>Q</i>), g	48,3 ± 9,69	44,6 ± 6,70
Svoris be vidaus organų (<i>q</i>), g	40,8 ± 8,03	38,8 ± 6,16
Individų skaičius (<i>n</i>)	28	42

Reikšmingų skirtumų tarp SM koncentracijų kontrolinės grupės žuvų audiniuose iškart po aklimacijos (0) bei po jos praėjus ilgesniam laiko tarpui (7, 14 ir 28 parų), nenustatyta (vienfaktorinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p > 0,05$). Atlikus statistinę analizę tarp ilgalaikių kontrolių ir poveikio grupių (7, 14 ir 28 parų) bei tarp kontrolės (0) ir poveikio grupių, gauti tie patys reikšmingi skirtumai tarp SM koncentracijų. Todėl tolimesnė statistinė analizė buvo atliekama poveikio grupės lyginant tik su kontroline grupe iškart po aklimacijos (0) (Stankevičiūte ir kt. 2017).

Duomenys apie vidutines SM koncentracijas *S. salar* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse skirtingu ekspozicijos laikotarpiu pateikti 17 paveiksle. Lyginant su kontrole (0), reikšmingas metalų kaupimasis žiaunose (Ni, Cr), kepenyse (Cr), inkstuose (Ni) ir raumenyse (Zn, Cr) buvo stebimas jau po 1 paros veikimo. Cinko ir Cu kaupimasis žiaunose ir kepenyse visą 28 parų

ekspozicijos laikotarpį nesiskyrė nuo kontrolės, tačiau šių SM kiekių pokyčiai inkstuose ir raumenyse buvo statistiškai reikšmingi (17 pav.).

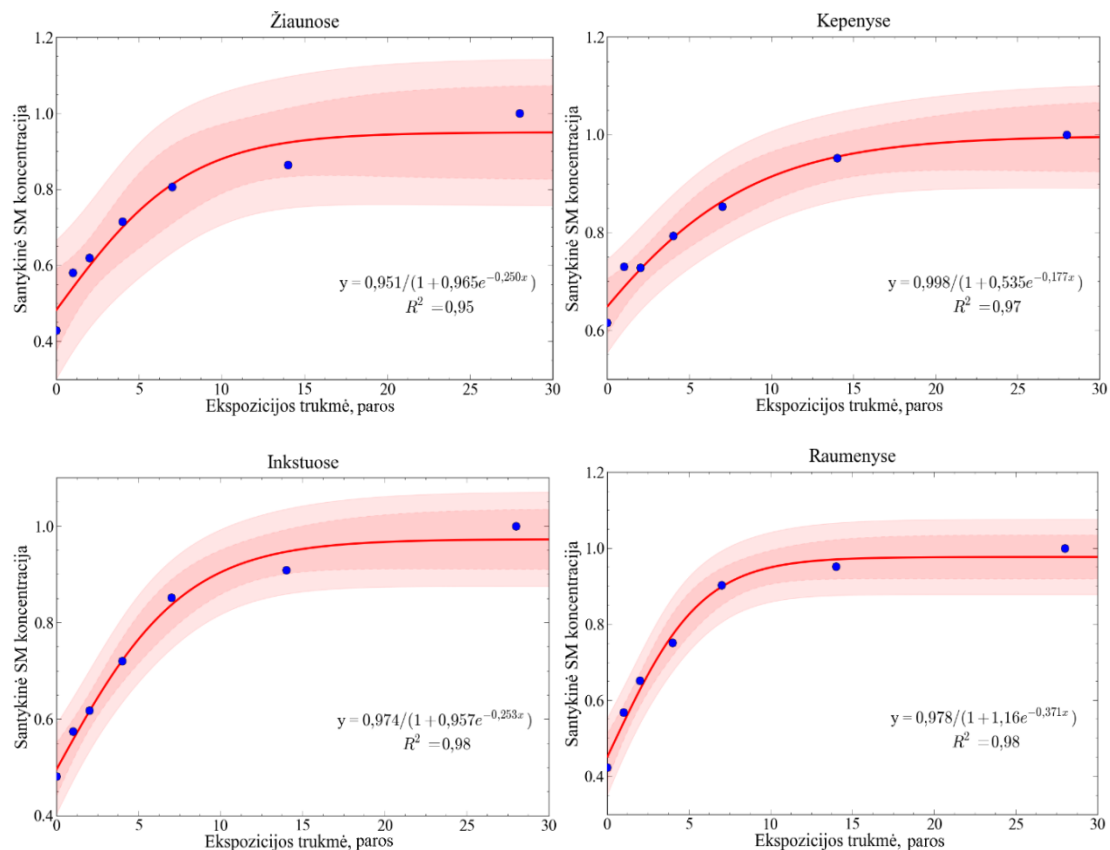




17 pav. Metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekis (mg/kg) *S. salar* audiniuose (žiaunose, kepenyse, inkstuose, raumenyse) (vidurkis \pm standartinis nuokrypis, $n = 7$). Žvaigždutė (*) žymi reikšmingus skirtumus nuo kontrolės (0) skirtingu ekspozicijos laikotarpiu (vienfaktorinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$). Y ašyje kadmio (Cd) koncentracija pateikta logaritminėje skalėje.

Tyrimų eigoje daugiausiai metalų kaupėsi žiaunose ir inkstuose, mažiausiai – raumenyse. Didžiausios buvo Zn ir Cu, mažiausios – Ni ir Pb koncentracijos. Cinkas, Ni, Cr ir Cd audiniuose kaupėsi šia seka: žiaunos > inkstai > kepenys > raumenys; Cu – kepenys > inkstai > žiaunos > raumenys; Pb – raumenys > žiaunos > inkstai > kepenys (17 pav.).

Metalų kaupimosi audiniuose priklausomybė nuo ekspozicijos trukmės yra netiesinio pobūdžio, todėl santykinio metalų kiekio žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse didėjimui eksperimento metu aproksimuoti panaudotas trijų parametų logistinis modelis (18 pav.).



18 pav. Santykinio SM kiekio *S. salar* audiniuose priklausomybės nuo ekspozicijos trukmės logistinis modelis (pavaizduoti santykinio SM kiekio vidurkiai, prognozė ir jos 95% pasikliautinas intervalas).

Logistinio modelio apskaičiavimui naudotas santykinis metalų kiekis tirtuose audiniuose. Jis buvo išreikštas kaip SM koncentracijos, nustatytos po 1, 2, 4, 7 ir 14 parų, santykis su SM koncentracija žuvyse eksperimento pabaigoje, t. y., po 28 ekspozicijos parų. Rezultatai rodo, kad visų keturių kūno audinių atveju, SM kaupimosi priklausomybės nuo ekspozicijos trukmės kreivės yra panašios formos ir pasirinktas aproksimacijai modelis gerai tinka, ką rodo aukštas modelio determinacijos koeficientas ($R^2 > 0,9$). Kaip matyti, metalai ekspozicijos pradžioje (vidutiniškai iki 7 parų) tirtuose audiniuose linę kaupintis intensyviau. Po to jų kaupimasis sulėtėjo, ilgėjant poveikio trukmei. Visu likusiu laikotarpiu (7, 14 ir 28 parų) metalų kiekis žiaunose, kepenyse ir inkstuose didėjo nežymiai, o raumenyse beveik nekito.

Konkretus laikas, kuriam praėjus metalų – Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd koncentracijos analizuojamuose *S. salar* audiniuose toliau reikšmingai nebekito, veikiant daugianariu SM mišiniu (MIX), nurodytas 18 lentelėje.

18 lentelė. Laikas, kuriam praėjus Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd koncentracija *S. salar* audiniuose nustoja reikšmingai kisti, veikiant daugianariu metalų mišiniu MIX.

Metalas	Audinys	Ekspozicijos trukmė, paros					
		1	2	4	7	14	28
Zn	Žiaunos	Nepasiekta pusiausvyra					
	Kepenys	Nepasiekta pusiausvyra					
	Inkstai	Nepasiekta pusiausvyra		Pasiiekta pusiausvyra			
	Raumenys	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
Cu	Žiaunos	Nepasiekta pusiausvyra					
	Kepenys	Nepasiekta pusiausvyra					
	Inkstai	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
	Raumenys	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
Ni	Žiaunos	Nepasiekta pusiausvyra					
	Kepenys	Nepasiekta pusiausvyra	Pasiiekta pusiausvyra				
	Inkstai	Nepasiekta pusiausvyra		Pasiiekta pusiausvyra			
	Raumenys	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
Cr	Žiaunos	Nepasiekta pusiausvyra					
	Kepenys	Nepasiekta pusiausvyra		Pasiiekta pusiausvyra			
	Inkstai	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
	Raumenys	Nepasiekta pusiausvyra	Pasiiekta pusiausvyra				
Pb	Žiaunos	Nepasiekta pusiausvyra					
	Kepenys	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
	Inkstai	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
	Raumenys	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		
Cd	Žiaunos	Nepasiekta pusiausvyra					
	Kepenys	Nepasiekta pusiausvyra					
	Inkstai	Nepasiekta pusiausvyra					
	Raumenys	Nepasiekta pusiausvyra			Pasiiekta pusiausvyra		

Nepasiekta pusiausvyra
 Pasiiekta pusiausvyra

Kaip matyti, skirtingų SM kaupimasis audiniuose ilgėjant ekspozicijos laikui nėra tapatus. Cinko ir Cu kiekiai, kurie priskiriami būtiniesiems metalams, kontrolės ir poveikio grupių žuvų žiaunose ir kepenyse reikšmingai nesiskyrė (žr. 17 pav.), t. y., Zn ir Cu minėtuose organuose nebuvo kaupiami ir optimali ekspozicijos trukmė jiems negalėjo būti nustatyta. Inkstuose ir raumenyse reikšmingas Zn ir Cu kaupimas baigėsi po 4, 14 ir 14, 7 parų, atitinkamai. Nikelio koncentracija žiaunose didėjo per visą veikimo laikotarpį, o kituose tirtuose audiniuose Ni koncentracija nustojo reikšmingai kisti skirtingu ekspozicijos laikotarpiu. Chromo ir Pb koncentracijos po tam tikro laiko tarpo nustojo reikšmingai kisti visuose analizuojamuose žuvų audiniuose. Kadmio, kurio biologinė funkcija žuvims iki šiol nėra nustatyta, kiekis visu ekspozicijos laikotarpiu reikšmingai didėjo visuose žuvų audiniuose, išskyrus raumenis (kiekis stabilizavosi po 7 parų). Atkreiptinas dėmesys į tai, kad *S.*

salar raumenyse stabilizavosi visų metalų koncentracijos, tačiau stabili būseną pasiekta po skirtingos ekspozicijos trukmės.

Tyrimo rezultatai rodo, kad daugumos SM stabili (pusiausvyra) koncentracija *S. salar* audiniuose nusistovi per 14 parų. Tai patvirtina ir 18 paveiksle parodytos santykinio SM kiekio kitimo kreivės – po 7 parų ekspozicijos SM koncentracijos didėjimas ženkliai sulėtėja. Atsižvelgiant į tai, tolimesniems eksperimentiniams tyrimams buvo pasirinkta 14-os parų ekspozicijos trukmė.

3.2.2.1 Rezultatų aptarimas

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad laikotarpis, būtinas daugmaž stabiliai SM koncentracijai audiniuose pasiekti, yra nevienodas. Jis gana smarkiai varijuoja priklausomai tiek nuo žuvų audinio, tiek ir nuo pačio sunkiojo metalo. Eksperimento pradžioje SM kaupimasis audiniuose buvo intensyvesnis, o ilgėjant ekspozicijos laikui SM akumuliacija sulėtėjo, t. y., koncentracija reikšmingai nebedidėjo. Statistiškai reikšmingas kelių metalų (Ni, Cr) kaupimasis audiniuose jau buvo stebimas po 1 paros poveikio. Metalai daugiausiai buvo linkę kauptis žiaunose ir inkstuose, mažiausiai – raumenyse. Tokį metalų pasiskirstymą audiniuose gali lemti tai, kad metalų jonai iš vandens paprastai absorbuojami pasyvios difuzijos dėka ar pernešami nešėjų (transporterių) per žiaunas, tai pat dėl skirtingo metalo afiniteto audiniui ir dėl audinio atliekamos funkcijos organizme (Jeziarska and Witeska, 2006). Be to, metalų kaupimasis yra dinaminis procesas, kurio metu SM patekimas ir šalinimas iš organizmo vyksta vienu metu (Streit 1998).

Šis tyrimas, kurio metu buvo sekami SM kiekio pokyčiai žuvų audiniuose priklausomai nuo ekspozicijos laiko, truko 28 paras. Eksperimento rezultatai atskleidė, kad daugumos metalų stabiliai koncentracijai žuvų audiniuose pasiekti pilnai pakanka 14 parų. Reikia paminėti, kad Cd kiekis žiaunose, kepenyse ir inkstuose, o Ni – žiaunose didėjo viso eksperimento metu, t. y., stabiliai būsenai pasiekti nepakako net 28 parų. Tai gali būti susiję su labai lėtu Cd pašalinimu iš organizmo. Larson et al. (1985) nurodo, kad Cd

vaivorykštinių upėtakių kepenyse ir inkstuose pusėjimo trukmė (angl. *half-life*) buvo ilgesnė nei 1-eri metai. Kadmiui gali prireikti ilgesnio veikimo laiko, kad koncentracija stabilizuotųsi visuose audiniuose. Nikelio bioakumuliacija *S. salar* žiaunose poveikio pradžioje didėjo, po to, ilgėjant ekspozicijos laikui, nereikšmingai sulėtėjo ir vėl pradėjo didėti. Šiuo atveju, Ni eliminacijos greitis galėjo būti lėtesnis nei patekimo greitis (Kargin and Çogun, 1999). Būtinieji metalai (Zn, Cu) iš audinių šalinami intensyviau, išlaikant tik organizmui būtiną kiekį (Bury et al., 2003). Dėl šios priežasties, Zn ir Cu kaupimasis kepenyse ir žiaunose, lyginant su kontroline grupe, beveik nevyko (skirtumai nereikšmingi).

Tirtų žuvų audinių tarpe, visų SM pusiausvyra skirtingu veikimo laikotarpiu buvo pasiekta tik raumenyse. Metalų kaupimosi lygis raumenyse yra gana žemas, dėl šio audinio didelio apsivalymo greičio (angl. *decontamination rate*) (Perera et al., 2015; Yeşilbudak and Erdem, 2014).

Daugelyje publikacijų, kuriose analizuota SM bioakumuliacija ar SM sąveika, informacija apie ekspozicijos trukmės parinkimo kriterijus nepateikiama. Vieni tyrimai trunka iki kelių valandų (Komjarova and Blust, 2009a), kiti – netgi iki 270 parų (Calamari et al., 1982). Dėl šios priežasties, skirtingų tyrėjų gautus rezultatus gana sunku palyginti tarpusavyje. Vieningos metodikos, kurioje būtų įvardinta optimali ekspozicijos trukmė tokio pobūdžio tyrimams, taip pat nėra. Mūsų žiniomis, šio darbo metu atliktas eksperimentas yra pirmasis eksperimentinis tyrimas, kurio metu nustatytas optimalus laiko tarpas (14 parų) metalų koncentracijos pusiausvyrai *S. salar* audiniuose pasiekti, veikiant žuvis daugianariu SM mišiniu esant DLK. Šio tyrimo rezultatai leis toliau vykdyti ir palyginti eksperimentinius tyrimo rezultatus, kurių metu bus analizuojami tų pačių SM kaupimosi dėsniumai skirtingų žuvų rūšių audiniuose.

3.2.3 Metalų kaupimosi dėsningumų tyrimas skirtingų žuvų rūšių audiniuose

3.2.3.1 SM kaupimasis *S. salar* audiniuose

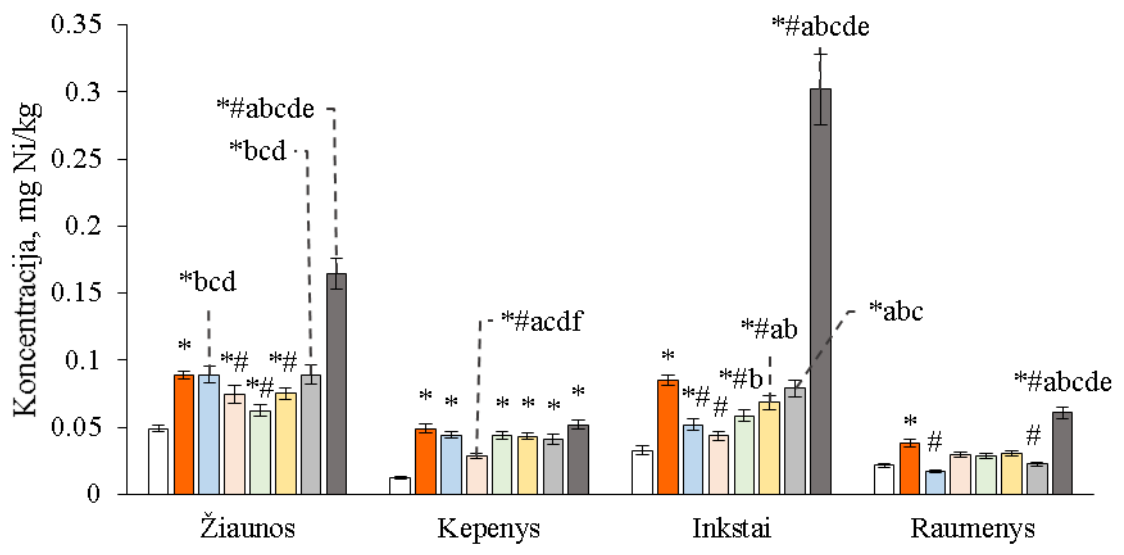
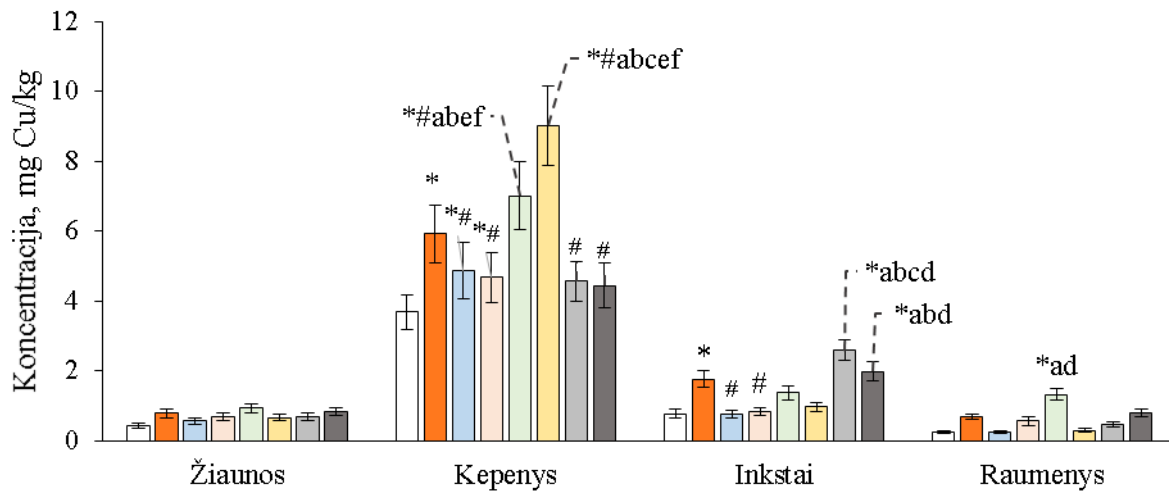
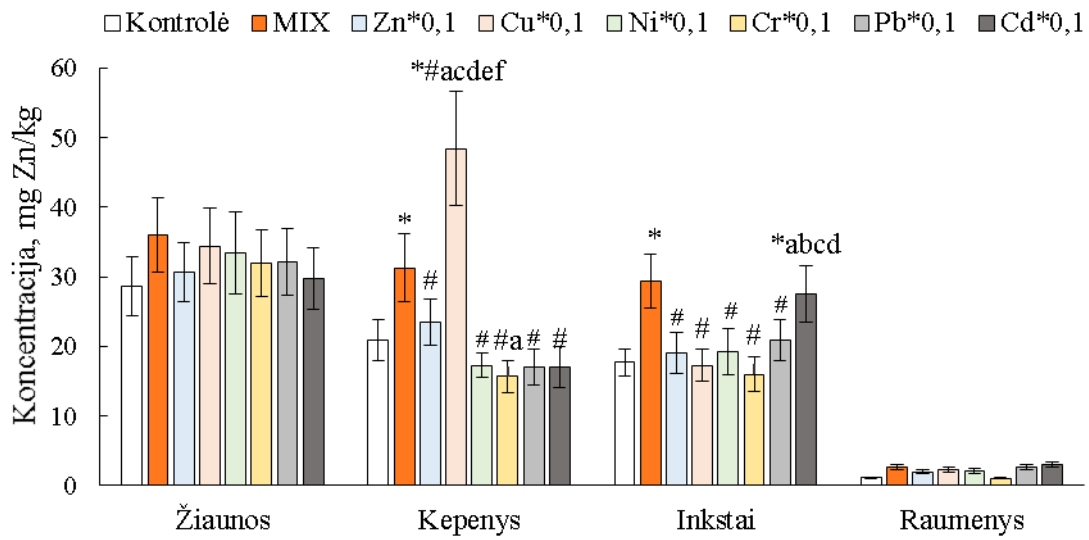
Sunkiųjų metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimosi dėsningumų *S. salar* audiniuose nustatymui, kontrolė ir poveikio grupės buvo sudarytos iš panašaus ilgio ir svorio *S. salar* individų (19 lentelė).

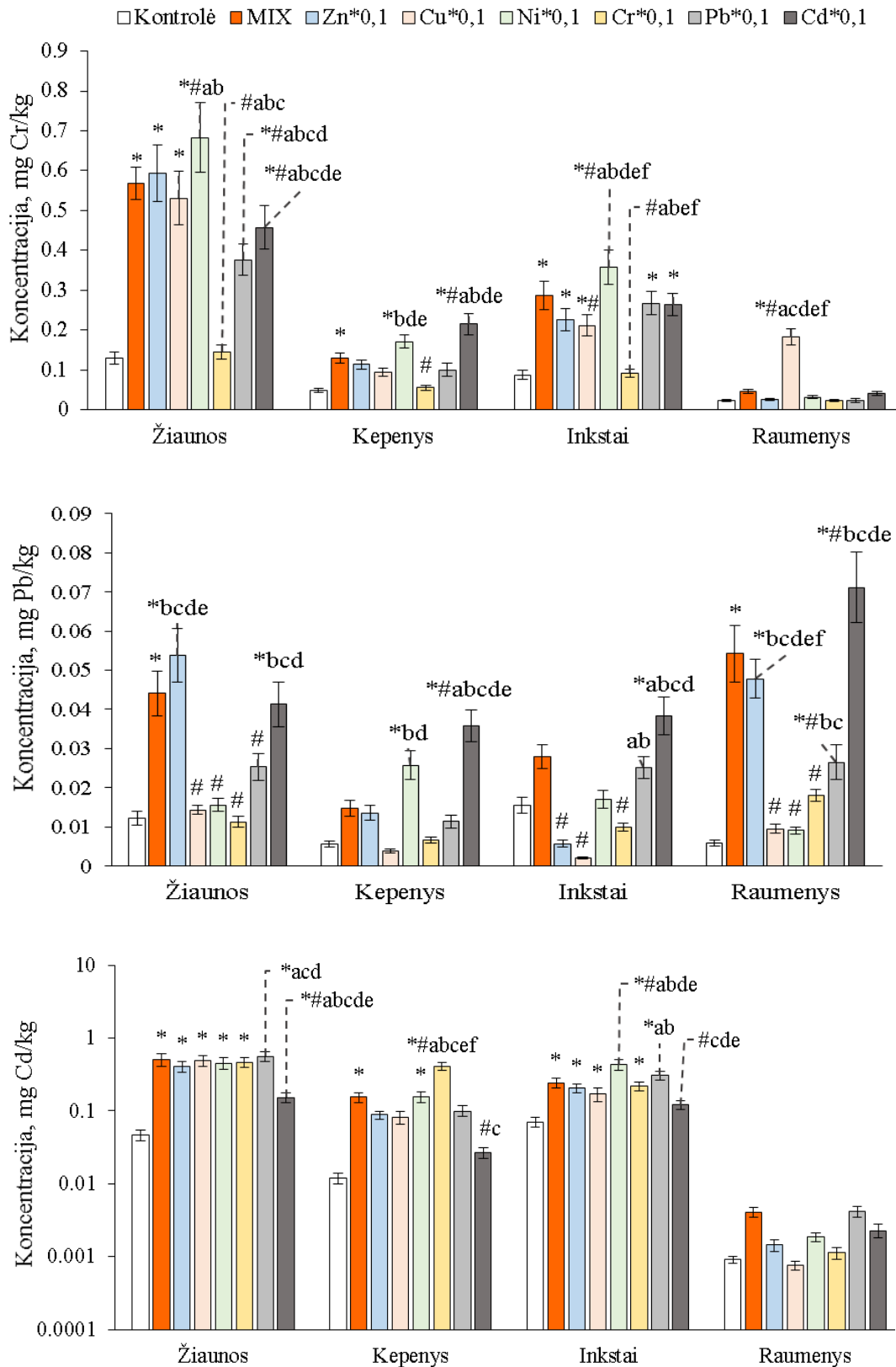
19 lentelė. Kontrolės ir poveikio grupių *S. salar* morfometriniai parametrai (vidurkis ± standartinis nuokrypis; $n = 7$).

Parametras	Kontrolė	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Bendras ilgis (L), mm	170,7 ± 8,50	163,6 ± 3,78	177,4 ± 7,41	181,9 ± 10,2	190,7 ± 7,06	188,7 ± 5,25	156,0 ± 6,0	150,6 ± 4,72
Kaudalinis ilgis (l _c), mm	162,1 ± 7,95	155,4 ± 3,71	168,9 ± 7,0	172,7 ± 10,3	182,4 ± 6,61	179,8 ± 5,19	147,6 ± 5,6	142,4 ± 4,71
Bendras svoris (Q), g	45,3 ± 6,72	40,5 ± 4,48	48,9 ± 4,17	48,6 ± 6,61	56,1 ± 4,56	57,9 ± 2,31	34,9 ± 3,17	31,3 ± 3,02
Svoris be vidaus organų (q), g	38,9 ± 5,97	34,8 ± 3,52	41,4 ± 3,34	41,8 ± 5,53	49,1 ± 3,97	50,1 ± 2,03	29,9 ± 2,52	26,1 ± 2,54

Poveikio grupės žuvys 14 parų buvo veikiamos 7-iais skirtingais daugianariais metalų mišiniais (MIX; Zn*0,1; Cu*0,1; Ni*0,1; Cr*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1) (žr. 2.4.3 poskyrį; 7, 8 lentelę). Metalų kiekiai, susikaupę kontrolės ir poveikio grupių *S. salar* audiniuose grafiškai atvaizduoti 19 paveiksle.

Veikiant skirtingų kombinacijų daugianariais metalų mišiniais, SM žuvų audiniuose kaupėsi nevienodai. Reikšmingų skirtumų tarp Zn bei Cu kiekių, sukauptų įvairių tipų SM mišiniais paveiktų bei kontrolinės grupės žuvų žiaunose ir raumenyse, nenustatyta; tik Cu kiekis, sukauptas raumenyse veikiant Ni*0,1 mišiniu reikšmingai skyrėsi nuo kontrolės. Reikšmingų Zn ir Cu skirtumų žiaunose ir raumenyse nėra ir lyginant skirtingais SM mišinių tipais paveiktų žuvų grupes tarpusavyje. Kepenyse Zn ir Cu daugiausia susikaupė veikiant, atitinkamai, Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais. Inkstuose Zn ir Cu kiekis buvo didžiausias veikiant, atitinkamai, MIX ir Pb*0,1 mišiniu. Veikiant skirtingais metalų mišiniais, didžiausi Zn kiekiai susikaupė žuvų žiaunose, mažiausi – raumenyse. Vario didžiausias kiekis nustatytas kepenyse, mažiausias – raumenyse (19 pav.).





19 pav. Metalų kiekis *S. salar* audiniuose, veikiant daugianariais metalų mišiniais (vidurkis ± standartinis nuokrypis, $n = 7$). Žvaigždutė (*) žymi verčių reikšmingus skirtumus nuo kontrolės; # – nuo MIX; a – nuo Zn*0,1; b – nuo Cu*0,1; c – nuo Ni*0,1; d – nuo Cr*0,1; e – Pb*0,1; f – Cd*0,1) (dvifaktorinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$). Y ašyje kadmio (Cd) koncentracija pateikta logaritminėje skalėje.

Nikelio kiekiai, sukaupti žiaunose, kepenyse ir inkstuose veikiant žuvis bet kuriuo iš SM mišinių, buvo statistiškai reikšmingai didesni, nei atitinkamuose kontrolinės grupės žuvų audiniuose (išskyrus Cu*0,1 veiktų žuvų inkstus). Raumenyse Ni kiekis, lyginant su kontrole, buvo reikšmingai didesnis tik MIX ir Cd*0,1 mišiniais paveiktose žuvyse. Didžiausi nikelio kiekiai visuose audiniuose susikaupė žuvis veikiant Cd*0,1 mišiniu. Daugiausiai Ni kaupiasi žuvų žiaunose ir inkstuose.

Skirtinguose audiniuose sukaupto Cr kiekis labai varijavo priklausomai nuo mišinio tipo, kuriuo buvo paveiktos žuvys. Ni*0,1 mišiniu paveiktų žuvų žiaunose ir inkstuose Cr kiekis buvo reikšmingai didesnis, nei visose kitose žuvų bandymo grupėse. Tuo tarpu kepenyse ir raumenyse reikšmingai didesni Cr kiekiai susikaupė, atitinkamai, Cd*0,1 ir Cu*0,1 mišiniais paveiktose žuvyse. Didžiausi Cr kiekiai nustatyti *S. salar* žiaunose, mažiausi – raumenyse.

Reikšmingai didesnis Pb kiekis nustatytas Cd*0,1 mišiniu paveiktų žuvų kepenyse, inkstuose ir raumenyse. Žiaunose reikšmingai didesni Pb kiekiai susikaupė Zn*0,1 mišiniu paveiktose žuvyse. Pb kiekiai Cu*0,1 ir Ni*0,1 eksponuotų žuvų inkstuose, žiaunose ir raumenyse bei Cr*0,1 ir Pb*0,1 eksponuotų žuvų inkstuose, žiaunose ir kepenyse nesiskyrė nuo kontrolinės grupės žuvų. Priešingai nei kiti metalai, Pb labiausiai kaupėsi žuvų raumenyse, mažiausiai – kepenyse ir inkstuose.

Reikšmingai didesni Cd kiekiai buvo sukaupti Pb*0,1 mišiniu paveiktose žuvų žiaunose. Tačiau kepenyse ir inkstuose didžiausi Cd kiekiai sukaupti veikiant, atitinkamai, Cr*0,1 ir Ni*0,1 mišiniais. Lyginant su kontroline žuvų grupe, didžiausius Cd kiekius SM mišiniuose laikytos žuvys sukauptė žiaunose ir inkstuose.

20-oje lentelėje yra pateikti duomenys apie Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd kiekių, sukauptų *S. salar* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse eksponuojant skirtingo tipo metalų mišiniuose pokyčių kryptis, lyginant su MIX mišinyje laikytų žuvų audiniuose sukauptais SM kiekiais. Duomenys rodo, kad sumažinus tam tikro metalo koncentraciją mišinyje 10 kartų (SM*0,1 mišinys), daugiausiai statistiškai reikšmingų metalų kiekio skirtumų lyginant

su MIX mišinyje laikytomis žuvimis nustatyta *S. salar* inkstuose (20 atvejų iš 36), mažiausiai – raumenyse (9 iš 36). SM*0,1 mišiniuose laikytų žuvų visuose audiniuose reikšmingai mažesnis metalų kaupimas stebėtas 46 atvejais iš 60, o reikšmingai didesnis – 14 iš 60 (lyginant su MIX). Reikšmingai mažesnis metalo kiekis dažniausiai buvo stebimas žuvų inkstuose (17 iš 46), o didesnis – kepenyse (6 iš 14).

20 lentelė. Vidutinis metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekis (mg/kg) *S. salar* ($n = 7$) audiniuose po laikymo MIX ir SM*0,1 mišiniuose.

Atlantinė laiša (<i>Salmo salar</i> L.)															
Žiaunos								Kepenys							
SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1	SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Zn	36,0	30,7↓	34,4↓	33,4↓	32,0↓	32,1↓	29,8↓	Zn	31,3	23,5↓	48,4↑	17,3↓	15,7↓	17,0↓	17,0↓
Cu	0,799	0,570↓	0,705↓	0,945↑	0,672↓	0,692↓	0,831↑	Cu	5,94	4,88↓	4,69↓	7,02↑	9,04↑	4,57↓	4,45↓
Ni	0,089	0,089↑	0,075↓	0,062↓	0,075↓	0,089↑	0,165↑	Ni	0,049	0,044↓	0,028↓	0,044↓	0,043↓	0,041↓	0,052↑
Cr	0,569	0,594↑	0,531↓	0,684↑	0,145↓	0,376↓	0,458↓	Cr	0,130	0,114↓	0,093↓	0,171↑	0,055↓	0,100↓	0,215↑
Pb	0,044	0,054↑	0,014↓	0,016↓	0,011↓	0,025↓	0,041↓	Pb	0,015	0,014↓	0,004↓	0,026↑	0,007↓	0,011↓	0,036↑
Cd	0,503	0,411↓	0,492↓	0,452↓	0,465↓	0,560↑	0,153↓	Cd	0,154	0,088↓	0,081↓	0,157↑	0,409↑	0,099↓	0,027↓

Inkstai								Raumenys							
SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1	SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Zn	29,4	19,0↓	17,3↓	19,3↓	16,0↓	20,9↓	27,5↓	Zn	2,69	1,98↓	2,25↓	2,10↓	1,07↓	2,69↑	3,06↑
Cu	1,77	0,777↓	0,842↓	1,38↓	0,978↓	2,59↑	1,99↑	Cu	0,708	0,252↓	0,573↓	1,33↑	0,305↓	0,479↓	0,796↑
Ni	0,085	0,052↓	0,044↓	0,059↓	0,068↓	0,079↓	0,302↑	Ni	0,038	0,017↓	0,029↓	0,028↓	0,031↓	0,022↓	0,061↑
Cr	0,287	0,226↓	0,212↓	0,358↑	0,092↓	0,268↓	0,264↓	Cr	0,046	0,026↓	0,182↑	0,032↓	0,024↓	0,023↓	0,042↓
Pb	0,028	0,006↓	0,002↓	0,017↓	0,010↓	0,025↓	0,038↑	Pb	0,054	0,048↓	0,010↓	0,009↓	0,018↓	0,027↓	0,071↑
Cd	0,243	0,205↓	0,170↓	0,428↑	0,217↓	0,304↑	0,121↓	Cd	0,004	0,002↓	0,001↓	0,002↓	0,001↓	0,004↑	0,002↓

- žymi reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp SM kiekių vidurkių SM*0,1 mišiniuose laikytose žuvyse lyginant su MIX mišinyje laikytomis žuvimis;
 – visuose audiniuose vykstantis metalo kiekio sumažėjimas (↓) arba padidėjimas (↑) SM*0,1 laikytose žuvyse lyginant su MIX laikytomis žuvimis.

Veikiant žuvis Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais, Ni ir Pb kiekis visuose audiniuose buvo mažesnis, nei veikiant MIX. Tačiau veikiant Cd*0,1 mišiniu, Ni kiekis visuose audiniuose padidėjo. Vario ir Cd kiekis audiniuose buvo linkęs mažėti, eksponuojant žuvis Zn*0,1 mišinyje. Cinko kaupimasis visuose audiniuose buvo mažesnis, veikiant žuvis Ni*0,1 ir Cr*0,1 mišiniu, o Cr kiekis buvo mažesnis veikiant Pb*0,1 mišiniu (lyginant su MIX).

Būtinųjų metalų (Zn ir Cu) kiekiai laišų kepenyse, veikiant žuvis skirtingais SM*0,1 mišiniais, buvo arba reikšmingai didesni, arba reikšmingai mažesni nei MIX mišinyje laikytų individų kepenyse. Nors skirtinguose

SM*0,1 mišiniuose laikytų žuvų raumenyse nustatyta mažiausiai reikšmingų SM pokyčių, lyginant su MIX laikytais žuvimis, tačiau beveik visais atvejais Ni ir Pb raumenyse buvo sukaupiama mažiau. Tik Cd*0,1 mišinyje laikytų lašišų raumenyse minėtų metalų kiekiai buvo reikšmingai didesni, nei MIX laikytose žuvyse.

Kai kurių SM kiekių vienos krypties pokyčiai veikiant žuvis skirtingais SM*0,1 mišiniais (padidėjimas ar sumažėjimas lyginant su MIX laikytais žuvimis) atsikartoja *visuose tirtuose žuvų audiniuose*. Pavyzdžiui, paveikus žuvis Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais, Ni kiekis visuose audiniuose yra mažesnis, nei MIX laikytose žuvyse, tačiau, paveikus Ni*0,1 mišiniu, Cu ir Cr kaupimasis ne visada sumažėja. Tačiau veikiant Cr*0,1 mišiniu, pasireiškia vienodų krypties Pb kiekio pokytis audiniuose. Cr*0,1 mišinyje laikytų žuvų audiniuose Pb kiekis buvo mažesnis, nei MIX laikytose žuvyse ir atvirkščiai: Pb*0,1 mišinyje laikytų žuvų audiniuose Cr kiekis buvo mažesnis, nei MIX laikytose žuvyse. Tačiau dažniausiai buvo stebimas tik vienašališkas, vieno iš SM kiekio pokytis SM*0,1 mišiniuose laikytų *S. salar* audiniuose, lyginant su MIX mišinyje laikytų žuvų audiniuose sukauptais SM kiekiais.

Šio tyrimo metu taip pat nustatyta, kad metalo DLK sumažinimas mišinyje 10 kartų, ne visada buvo lydimas reikšmingai mažesnio to paties metalo kaupimosi audiniuose lyginant su žuvimis laikytais kituose daugianariuose SM mišiniuose. Taip pat, 14 atvejų iš 168, reikšmingai didesnis tam tikrų metalų kiekis nustatytas tam tikrame SM*0,1 mišinyje, o ne MIX mišinyje eksponuotų žuvų audiniuose. Tai netiesiogiai rodo, kad tarp SM vyksta sąveikos, lemiančios intensyvesnę vieno ar kito metalo patekimą į žuvų audinius.

3.2.3.2 SM kaupimasis *R. rutilus* audiniuose

Analogiškais kontroliuojamomis bandymo sąlygomis, metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimosi dėsniumai buvo tiriami *R. rutilus* audiniuose. Kontrolei ir poveikio grupėms buvo atrinkti panašaus ilgio ir svorio individai (21 lentelė).

21 lentelė. Kontrolės ir poveikio grupių *R. rutilus* morfometriniai parametrai (vidurkis \pm standartinis nuokrypis; $n = 7$).

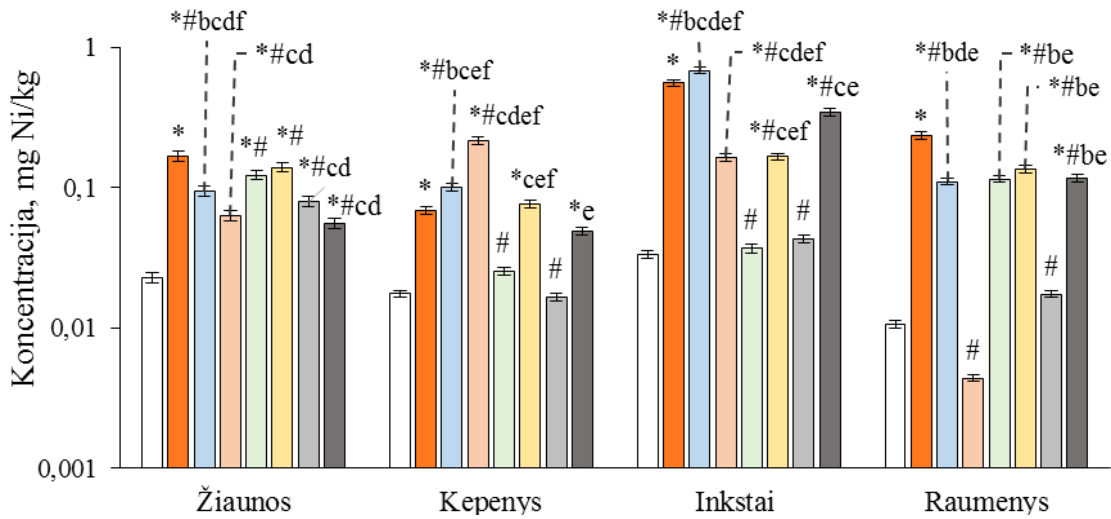
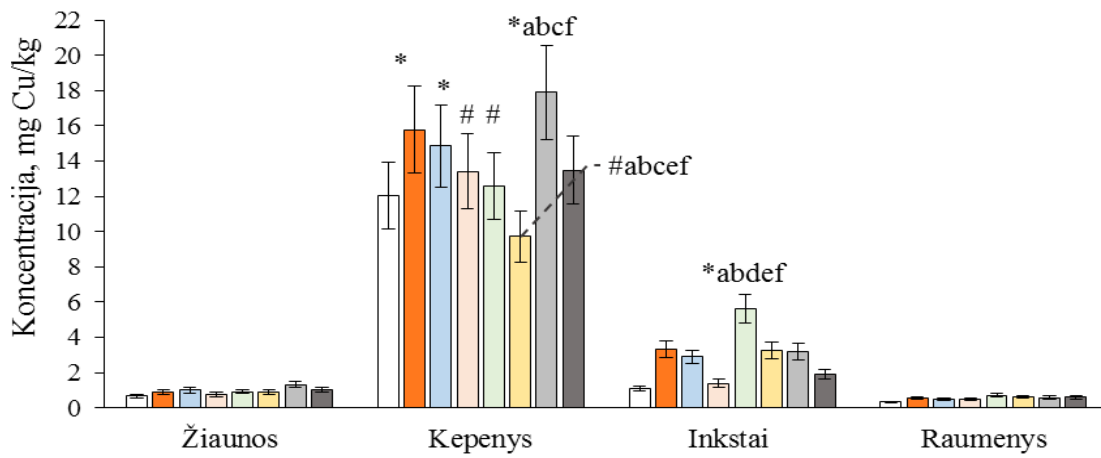
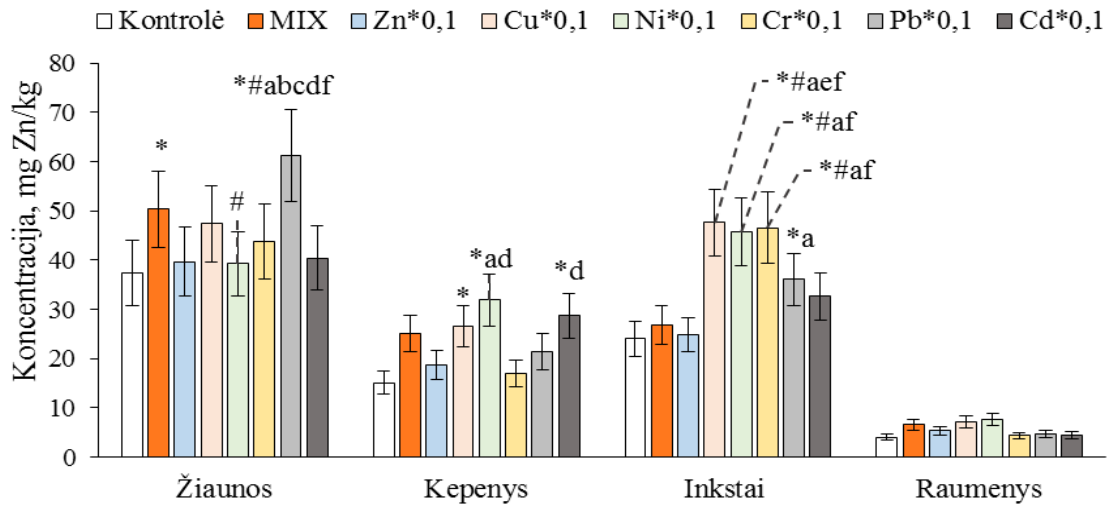
Parametras	Kontrolė	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Bendras ilgis (<i>L</i>), mm	154,5 \pm 6,24	153,6 \pm 9,88	156,4 \pm 17,7	161,1 \pm 19,3	164,3 \pm 15,1	167,1 \pm 11,5	165,0 \pm 8,66	162,9 \pm 9,51
Standartinis ilgis (<i>l</i>), mm	133,3 \pm 5,53	135,7 \pm 9,32	132,9 \pm 15,2	138,6 \pm 17,3	142,1 \pm 15,0	144,3 \pm 8,4	14,0 \pm 7,07	141,4 \pm 9,00
Bendras svoris (<i>Q</i>), g	47,0 \pm 9,04	43,8 \pm 6,51	44,6 \pm 15,5	50,9 \pm 20,1	56,0 \pm 16,7	58,1 \pm 10,2	53,0 \pm 10,6	53,6 \pm 10,7
Svoris be vidaus organų (<i>q</i>), g	39,0 \pm 6,29	37,5 \pm 5,78	38,8 \pm 13,9	44,1 \pm 18,0	46,1 \pm 12,1	48,2 \pm 8,55	44,4 \pm 8,12	44,4 \pm 8,06

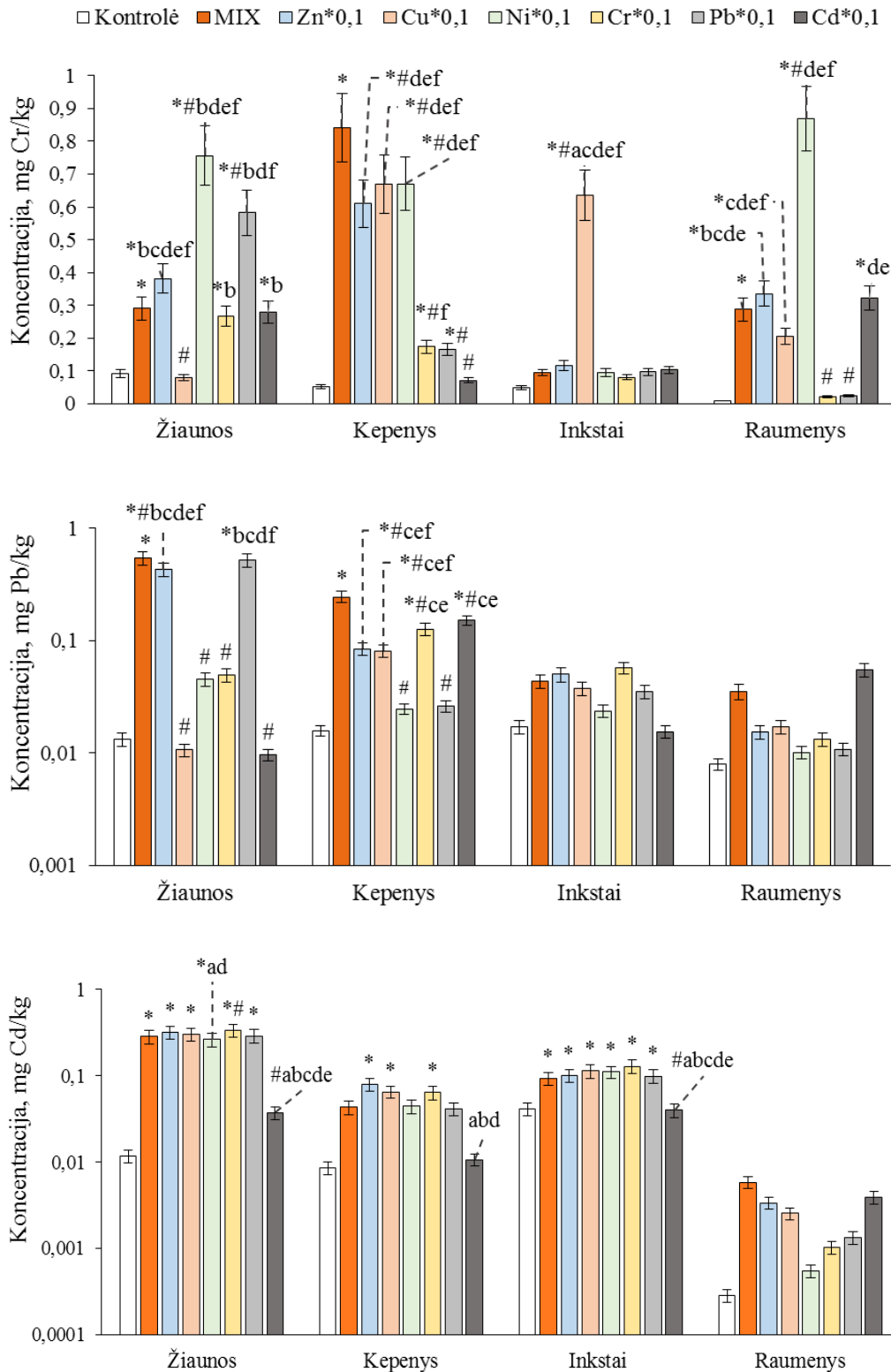
Metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekiai, susikaupę kontrolės ir poveikio grupių *R. rutilus* audiniuose grafiškai atvaizduoti 20 paveiksle. Metalų mišiniuose laikytose žuvyse didžiausi Zn kiekiai kaupėsi žiaunose, mažiausi – raumenyse. Žiaunose Zn labiausiai kaupėsi eksponuojant žuvis Pb*0,1 mišinyje, kepenyse – Ni*0,1, o inkstuose – Cu*0,1 mišinyje (20 pav.). Cinko kiekiai, sukaupti *R. rutilus* raumenyse veikiant daugianariais SM mišiniais nesiskyrė nuo kiekių, sukauptų kontrolinės grupės žuvyse ($p > 0,05$).

Vario kiekiai SM mišiniuose laikytų *R. rutilus* žiaunose ir raumenyse nesiskyrė nuo kiekių atitinkamuose kontrolinės grupės žuvų audiniuose. Kepenyse reikšmingai didesnius Cu kiekius sukauptė Pb*0,1 mišinyje laikytos, o inkstuose – Ni*0,1 mišinyje laikytos žuvys.

Nikelio kaupimasis audiniuose itin buvo priklausomas nuo kitų SM koncentracijų santykio mišinyje. Ni kiekiai daugianariais SM mišiniais paveiktų žuvų audiniuose net 22 atvejais iš 28 buvo reikšmingai didesni, nei kontrolinės grupės žuvyse. Žiaunose ir raumenyse didžiausius Ni kiekius akumulavo MIX laikytos žuvys, kepenyse – Cu*0,1, inkstuose – Zn*0,1 mišinyje laikytos žuvys. Labiausiai Ni akumuliovosi *R. rutilus* inkstuose, mažiausiai – kepenyse.

Cr akumuliacija *R. rutilus* žiaunose ir raumenyse buvo reikšmingai didesnė Ni*0,1 mišinyje laikytose žuvyse, kepenyse – MIX, o inkstuose – Cu*0,1 mišinyje laikytose žuvyse. Didžiausi Cr kiekiai nustatyti *R. rutilus* kepenyse, mažiausi – inkstuose (20 pav.).





20 pav. Metalų kiekis *R. rattus* audiniuose, veikiant daigianariais SM mišiniais (vidurkis \pm standartinis nuokrypis, $n = 7$). Žvaigždutė (*) žymi verčių reikšmingus skirtumus nuo kontrolės; # – nuo MIX; a – nuo Zn*0,1; b – nuo Cu*0,1; c – nuo Ni*0,1; d – nuo Cr*0,1; e – Pb*0,1; f – Cd*0,1) (dvifaktoriinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$). Y ašyse nikelio (Ni), švino (Pb) ir kadmio (Cd) koncentracijos pateiktos logaritminėje skalėje.

Reikšmingų skirtumų tarp Pb kiekių, sukauptų įvairių tipų SM mišiniais paveiktų bei kontrolinės grupės žuvų inkstuose ir raumenyse, nenustatyta ($p > 0,05$). Žiaunose ir kepenyse Pb daugiausiai sukauptė MIX mišinyje laikytos *R. rutilus*. Pb akumuliacija buvo reikšmingai didesnė ir Pb*0,1 mišinyje laikytų žuvų žiaunose lyginant su kontrole. Tai rodo, kad daugianariame SM mišinyje, sumažinus Pb DLK 10 kartų, *R. rutilus* žiaunose vis tiek sukaupiama reikšmingai daugiau Pb, lyginant su kontrolinės grupės žuvų žiaunomis, t. y., kitų metalų buvimas tirpale sustiprino Pb kaupimąsi. Mažiausi Pb kiekiai nustatyti *R. rutilus* raumenyse.

Reikšmingų skirtumų tarp Cd kiekių, sukauptų įvairių tipų SM mišiniais paveiktų bei kontrolinės grupės žuvų raumenyse, nenustatyta ($p > 0,05$). Žiaunose ir inkstuose reikšmingai daugiau Cd susikaupė Cr*0,1 mišinyje, o kepenyse – Zn*0,1 ir Cu*0,1 mišiniuose laikytose žuvyse. Cd labiausiai buvo linkęs kauptis *R. rutilus* žiaunose, mažiausiai – raumenyse (20 pav.).

22-oje lentelėje yra pateikti duomenys apie Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd kiekių, sukauptų *R. rutilus* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse eksponuojant skirtingo tipo metalų mišiniuose pokyčių kryptis, lyginant su MIX mišinyje laikytų žuvų audiniuose sukauptais SM kiekiais. Duomenys rodo, kad sumažinus tam tikro metalo koncentraciją mišinyje 10 kartų, daugiausiai statistiškai reikšmingų metalų kiekio skirtumų lyginant su MIX mišinyje laikytais žuvimis nustatyta *R. rutilus* kepenyse (19 atvejų iš 36), mažiausiai – raumenyse (9 iš 36). SM*0,1 mišiniuose laikytų žuvų visuose audiniuose reikšmingai mažesnis metalų kaupimasis stebėtas 45 atvejais iš 57, o reikšmingai didesnis – 12 iš 57 (lyginant su MIX). Reikšmingai mažesnis metalo kiekis dažniausiai buvo stebimas *R. rutilus* kepenyse (17 iš 45), o didesnis – inkstuose (5 iš 12).

Pastebima tendencija, kad eksponuojant *R. rutilus* Cu*0,1; Cr*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose, Ni kiekis visuose audiniuose (išskyrus kepenyse, veikiant Cu*0,1 ir Cr*0,1) buvo mažesnis, nei veikiant MIX. Pb kiekiai taip pat yra mažesni Cu*0,1 ir Ni*0,1 mišiniuose laikytų žuvų audiniuose, lyginant su MIX paveiktomis žuvimis. Visuose audiniuose nustatyti vienašališki metalų

kiekio pokyčiai (išskyrus Pb kiekį, veikiant Ni*0,1 ir Ni kiekį veikiant Pb*0,1 mišiniu, kurio metu pasireiškė vienodų kryptių SM kiekių pokytis) (22 lentelė).

22 lentelė. Vidutinis metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekis (mg/kg) *R. rutilus* ($n = 7$) audiniuose po laikymo MIX ir SM*0,1 mišiniuose.

Paprastoji kuoja (<i>Rutilus rutilus</i> L.)															
Žiaunos								Kepenyse							
SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1	SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Zn	50,3	39,7↓	47,5↓	39,3↓	43,9↓	61,3↑	40,5↓	Zn	25,1	18,6↓	26,5↑	31,9↑	17,0↓	21,5↓	28,8↑
Cu	0,919	1,00↑	0,748↓	0,921↑	0,907↓	1,308↑	1,00↑	Cu	15,8	14,9↓	13,4↓	12,6↓	9,72↓	17,9↑	13,5↓
Ni	0,168	0,096↓	0,064↓	0,122↓	0,139↓	0,080↓	0,056↓	Ni	0,069	0,101↑	0,215↑	0,025↓	0,076↑	0,016↓	0,049↓
Cr	0,291	0,382↑	0,079↓	0,756↑	0,267↓	0,583↑	0,280↓	Cr	0,842	0,610↓	0,670↓	0,671↓	0,173↓	0,165↓	0,071↓
Pb	0,545	0,429↓	0,011↓	0,045↓	0,049↓	0,525↓	0,010↓	Pb	0,246	0,085↓	0,081↓	0,025↓	0,126↓	0,026↓	0,152↓
Cd	0,284	0,320↑	0,301↑	0,264↓	0,336↑	0,289↑	0,037↓	Cd	0,043	0,079↑	0,065↑	0,044↑	0,064↑	0,041↓	0,011↓

Inkstai								Raumenys							
SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1	SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Zn	26,9	24,9↓	47,7↑	45,7↑	46,6↑	36,1↑	32,7↑	Zn	6,60	5,36↓	7,21↑	7,59↑	4,35↓	4,80↓	4,50↓
Cu	3,34	2,89↓	1,39↓	5,62↑	3,24↓	3,18↓	1,93↓	Cu	0,556	0,465↓	0,496↓	0,718↑	0,608↑	0,582↑	0,593↑
Ni	0,558	0,683↑	0,164↓	0,037↓	0,166↓	0,043↓	0,347↓	Ni	0,237	0,110↓	0,004↓	0,115↓	0,136↓	0,017↓	0,117↓
Cr	0,095	0,117↑	0,636↑	0,094↓	0,080↓	0,097↑	0,103↑	Cr	0,287	0,336↑	0,205↓	0,868↑	0,022↓	0,024↓	0,322↑
Pb	0,043	0,050↑	0,038↓	0,024↓	0,057↑	0,035↓	0,015↓	Pb	0,036	0,015↓	0,017↓	0,010↓	0,013↓	0,011↓	0,055↑
Cd	0,093	0,101↑	0,114↑	0,111↑	0,128↑	0,099↑	0,040↓	Cd	0,006	0,003↓	0,003↓	0,001↓	0,001↓	0,001↓	0,004↓

■ – žymi reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp SM kiekių vidurkių SM*0,1 mišiniuose laikytose žuvyse lyginant su MIX mišinyje laikytomis žuvimis;

— – visuose audiniuose (išskyrus Ni kepenyse, veikiant Cu*0,1 ir Cr*0,1) įvykstantis metalo kiekio sumažėjimas (↓) arba padidėjimas (↑) SM*0,1 laikytose žuvyse lyginant su MIX laikytomis žuvimis.

Kaip ir *S. salar* atveju, metalo DLK sumažinimas mišinyje 10 kartų, ne visada buvo lydimas reikšmingai mažesnio to paties metalo kaupimosi *R. rutilus* audiniuose lyginant su kitais daigianariais SM mišiniais. Taip pat, 12 atvejų iš 168, reikšmingai didesnis SM kiekis nustatytas tam tikrame SM*0,1 mišinyje, o ne MIX mišinyje eksponuotų žuvų audiniuose.

3.2.3.3 SM kaupimasis *P. fluviatilis* audiniuose

Analogiškomis kontroliuojamomis bandymo sąlygomis, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd kaupimosi dėsningumai buvo tiriami *P. fluviatilis* audiniuose. Kontrolei ir poveikio grupėms, buvo atrinkti panašaus ilgio ir svorio individai (23 lentelė).

23 lentelė. Kontrolės ir poveikio grupių *P. fluviatilis* morfometriniai parametrai (vidurkis \pm standartinis nuokrypis; $n = 7$).

Parametras	Kontrolė	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Bendras ilgis (<i>L</i>), mm	180,7 \pm 7,32	172,9 \pm 10,7	152,1 \pm 5,67	153,6 \pm 5,56	175,0 \pm 18,9	160,0 \pm 7,07	174,3 \pm 12,7	177,9 \pm 17,5
Standartinis ilgis (<i>l</i>), mm	158,6 \pm 5,56	151,1 \pm 10,5	137,1 \pm 5,67	13,6 \pm 3,45	155,0 \pm 15,6	139,3 \pm 6,73	154,3 \pm 11,3	157,9 \pm 14,7
Bendras svoris (<i>Q</i>), g	73,7 \pm 11,0	61,0 \pm 8,58	39,4 \pm 2,74	41,1 \pm 5,41	67,6 \pm 24,0	43,2 \pm 7,42	60,0 \pm 15,5	65,5 \pm 25,7
Svoris be vidaus organų (<i>q</i>), g	56,1 \pm 13,0	49,2 \pm 9,21	34,0 \pm 2,56	35,9 \pm 5,00	54,7 \pm 20,5	38,4 \pm 6,74	45,3 \pm 11,0	53,6 \pm 21,3

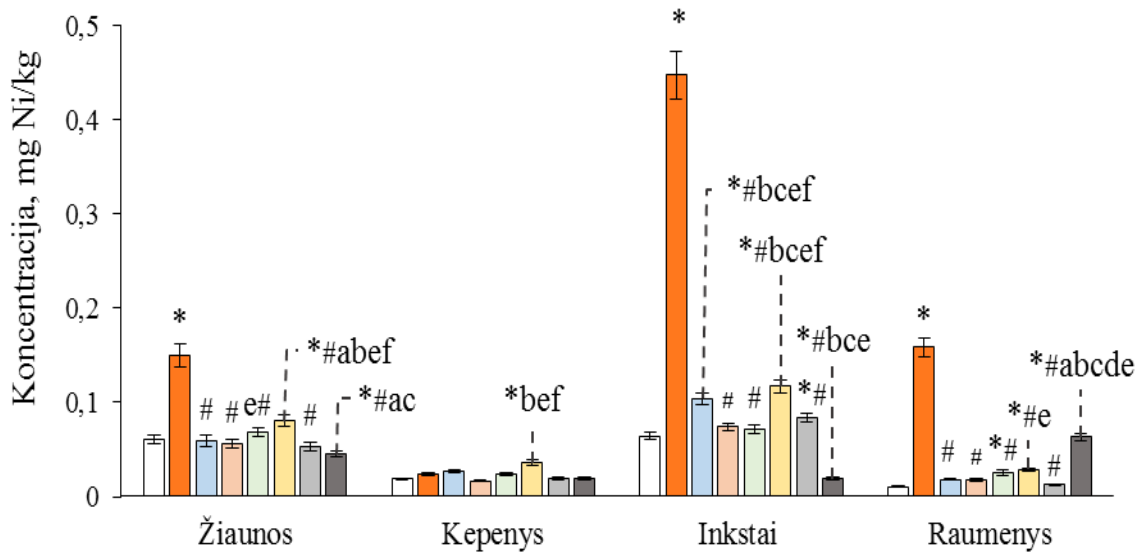
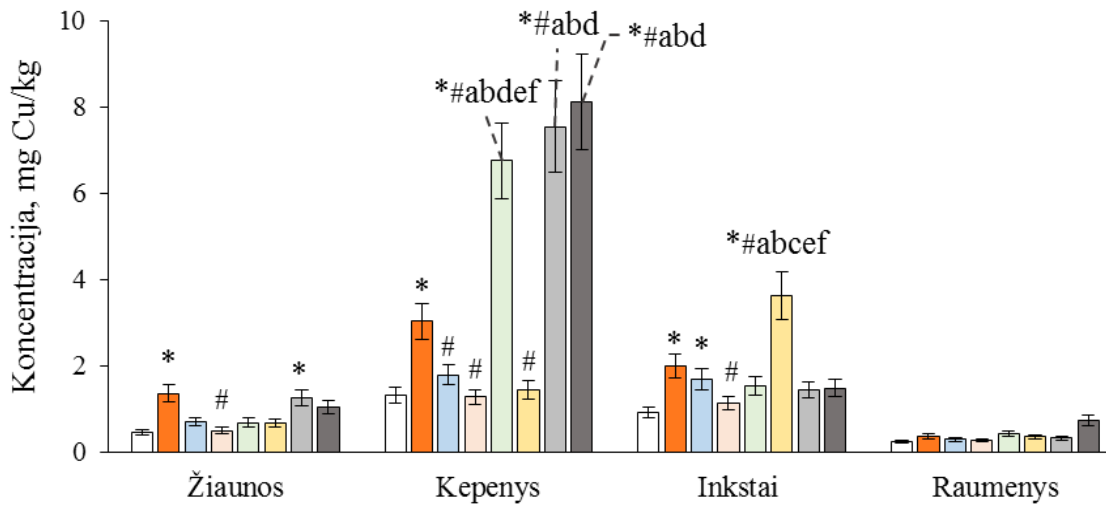
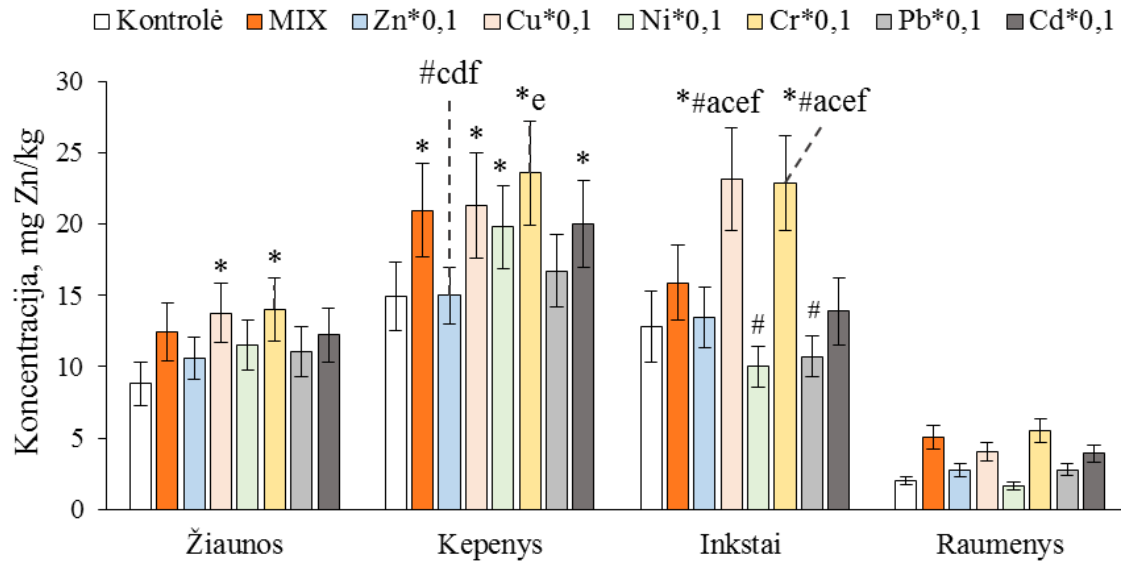
Metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekiai, susikaupę kontrolės ir poveikio grupių *P. fluviatilis* audiniuose grafiškai atvaizduoti 21 paveiksle. Reikšmingai didesnius Zn kiekius žiaunose, kepenyse ir inkstuose sukaupe Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniuose laikyti *P. fluviatilis* individai. Cinko kiekiai SM mišiniuose laikytų žuvų raumenyse nesiskyrė nuo kiekių atitinkamuose kontrolinės grupės žuvų audiniuose.

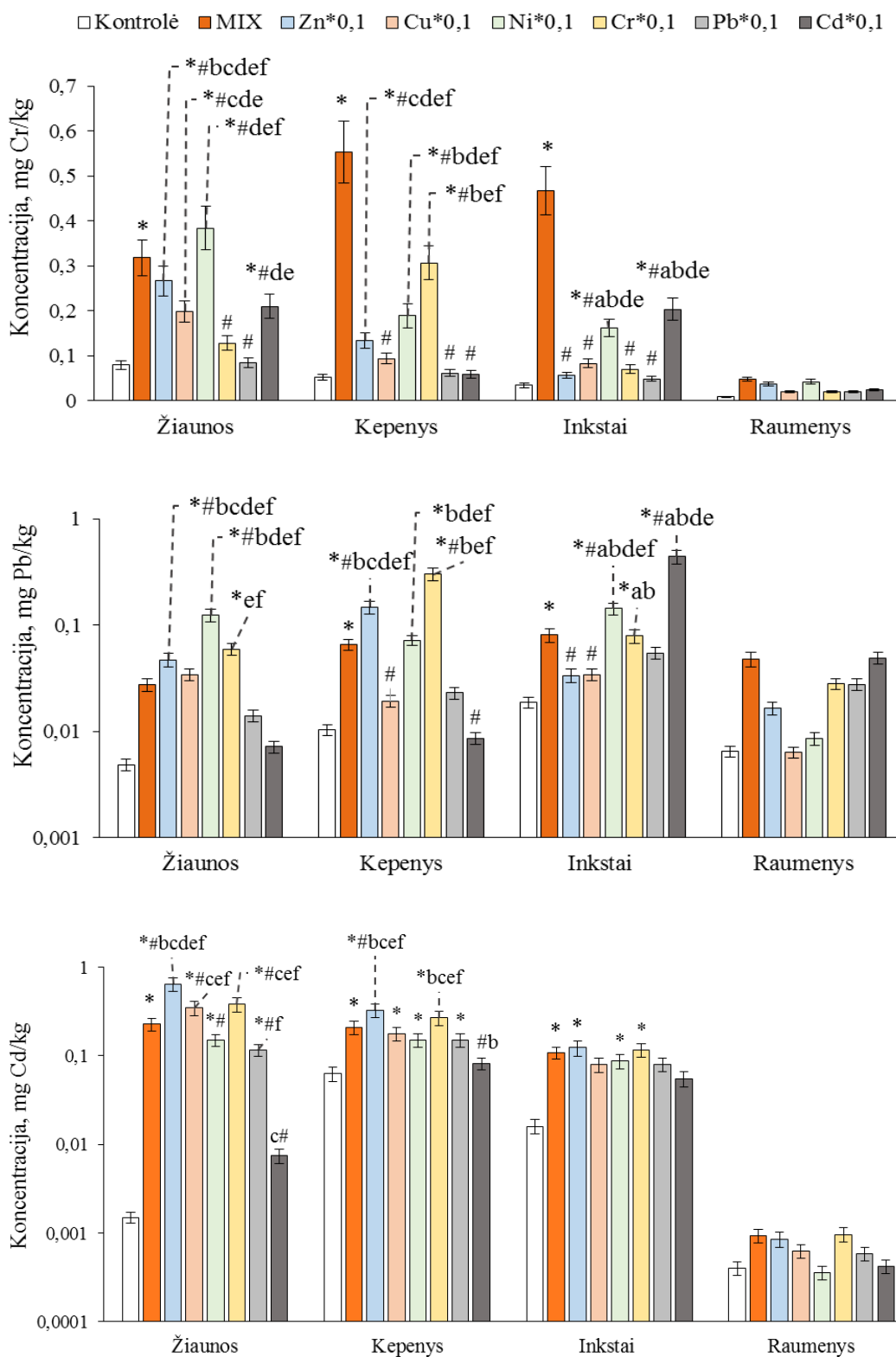
Lyginant su kontrole, reikšmingai didesnius Cu kiekius kepenyse sukaupe MIX, Ni*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose laikytos žuvys. Raumenyse, kaip ir Zn atveju, reikšmingų skirtumų nenustatyta. Didžiausius Cu kiekius *P. fluviatilis* kaupė kepenyse, mažiausius – raumenyse (21 pav.).

Reikšmingai didesnius Ni kiekius žiaunose, inkstuose ir raumenyse sukaupe MIX mišinyje laikyti *P. fluviatilis*. Ni kiekis buvo reikšmingai didesnis ir Cd*0,1 mišinyje laikytų žuvų raumenyse. Didžiausius Ni kiekius *P. fluviatilis* sukaupe inkstuose, mažiausius – raumenyse.

Chromo kiekiai SM mišiniuose laikytų *P. fluviatilis* raumenyse nesiskyrė nuo kiekių kontrolinės grupės žuvyse. Žiaunose reikšmingai didesnius Cr kiekius sukaupe Ni*0,1 mišinyje laikytos, o kepenyse ir inkstuose – MIX mišinyje laikytos žuvys.

Švino kiekiai SM mišiniuose laikytų *P. fluviatilis* raumenyse nesiskyrė nuo kiekių kontrolinės grupės žuvyse. Žiaunose reikšmingai didesnius Pb kiekius sukaupe Ni*0,1 mišinyje laikytos, kepenyse – Cr*0,1, o inkstuose – Cd*0,1 mišinyje laikytos žuvys. Didžiausius Pb kiekius *P. fluviatilis* kaupė inkstuose, mažiausius – raumenyse.





21 pav. Metalų kiekis *P. fluviatilis* audiniuose, veikiant daugianariais SM mišiniais (vidurkis \pm standartinis nuokrypis, $n = 7$). Žvaigždutė (*) žymi verčių reikšmingus skirtumus nuo kontrolės; # – nuo MIX; a – nuo Zn*0,1; b – nuo Cu*0,1; c – nuo Ni*0,1; d – nuo Cr*0,1; e – Pb*0,1; f – Cd*0,1) (dvifaktoriinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$). Y ašyse švino (Pb) ir kadmio (Cd) koncentracijos pateiktos logaritminėje skalėje.

Kadmio kiekiai SM mišiniuose laikytų *P. fluviatilis* raumenyse nesiskyrė nuo kiekių kontrolinės grupės žuvyse. Kituose audiniuose reikšmingai didesnius Cd kiekius sukaupe Zn*0,1 mišinyje laikytos žuvys. Didžiausius Cd kiekius *P. fluviatilis* kaupė žiaunose, mažiausius – raumenyse.

24-oje lentelėje yra pateikta palyginamoji informacija apie vidutinius Zn, Cu, Ni, Cr, Pb ir Cd kiekius, sukauptus *P. fluviatilis* žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse veikiant skirtingo tipo metalų mišiniais. Sumažinus tam tikro metalo koncentraciją mišinyje 10 kartų, daugiausiai statistiškai reikšmingų metalų kiekio skirtumų lyginant su MIX mišinyje laikytais žuvimis nustatyta *P. fluviatilis* inkstuose (22 atvejai 36), mažiausiai – raumenyse (6 iš 36). SM*0,1 mišiniuose laikytų žuvų visuose audiniuose reikšmingai mažesnis metalų kaupimasis stebėtas 51 atveju iš 68, o reikšmingai didesnis – 17 iš 68 (lyginant su MIX).

24 lentelė. Vidutinis metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) kiekis (mg/kg) *P. fluviatilis* ($n = 7$) audiniuose po laikymo MIX ir SM*0,1 mišiniuose.

Paprastasis europinis ešeris (<i>Perca fluviatilis</i> L.)															
Žiaunos								Kepenys							
SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1	SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Zn	12,5	10,6↓	13,8↑	11,6↓	14,0↑	11,0↓	12,2↓	Zn	20,9	15,0↓	21,3↑	19,8↓	23,6↑	16,7↓	20,0↓
Cu	1,36	0,703↓	0,504↓	0,687↓	0,675↓	1,27↓	1,05↓	Cu	3,04	1,80↓	1,28↓	6,75↑	1,44↓	7,54↑	8,11↑
Ni	0,150	0,060↓	0,056↓	0,069↓	0,080↓	0,053↓	0,045↓	Ni	0,024	0,026↑	0,016↓	0,023↓	0,036↑	0,020↓	0,019↓
Cr	0,318	0,267↓	0,199↓	0,385↑	0,128↓	0,084↓	0,210↓	Cr	0,553	0,134↓	0,094↓	0,190↓	0,307↓	0,062↓	0,059↓
Pb	0,028	0,047↑	0,034↑	0,124↑	0,060↑	0,014↓	0,007↓	Pb	0,066	0,148↑	0,019↓	0,072↑	0,301↑	0,023↓	0,009↓
Cd	0,227	0,649↑	0,348↑	0,151↓	0,382↑	0,117↓	0,007↓	Cd	0,211	0,326↑	0,177↓	0,151↓	0,268↑	0,150↓	0,082↓

Inkstai								Raumenys							
SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1	SM	MIX	Zn*0,1	Cu*0,1	Ni*0,1	Cr*0,1	Pb*0,1	Cd*0,1
Zn	15,9	13,4↓	23,1↑	10,0↓	22,9↑	10,7↓	13,9↓	Zn	5,08	2,76↓	4,06↓	1,68↓	5,52↑	2,77↓	3,92↓
Cu	1,99	1,69↓	1,14↓	1,54↓	3,62↑	1,46↓	1,49↓	Cu	0,372	0,295↓	0,277↓	0,432↑	0,358↓	0,330↓	0,738↑
Ni	0,447	0,104↓	0,074↓	0,071↓	0,117↓	0,084↓	0,019↓	Ni	0,159	0,018↓	0,018↓	0,026↓	0,029↓	0,013↓	0,063↓
Cr	0,468	0,058↓	0,083↓	0,162↓	0,070↓	0,049↓	0,204↓	Cr	0,048	0,037↓	0,020↓	0,043↓	0,020↓	0,020↓	0,024↓
Pb	0,081	0,034↓	0,034↓	0,143↑	0,079↓	0,055↓	0,442↑	Pb	0,048	0,016↓	0,006↓	0,009↓	0,028↓	0,028↓	0,049↑
Cd	0,109	0,123↑	0,080↓	0,087↓	0,117↑	0,080↓	0,055↓	Cd	0,00094	0,0008↓	0,0006↓	0,0004↓	0,0009↑	0,0006↓	0,0004↓

- – žymi reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp SM kiekių vidurkių SM*0,1 mišiniuose laikytose žuvyse lyginant su MIX mišinyje laikytais žuvimis;
- – visuose audiniuose (išskyrus Ni kepenyse, veikiant Zn*0,1 ir Cr*0,1) įvykstantis metalo kiekio sumažėjimas (↓) arba padidėjimas (↑) SM*0,1 laikytose žuvyse lyginant MIX laikytais žuvimis.

Visuose Zn*0,1 mišinyje laikytų žuvų audiniuose Cu ir Cr kiekis buvo mažesnis, nei MIX laikytose žuvyse. Chromo kiekis taip pat buvo mažesnis Cu*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose laikytų *P. fluviatilis* audiniuose (24 lentelė).

Cinko kiekis buvo mažesnis Ni*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose eksponuotų žuvų audiniuose, t. y., priešingai nei Cr*0,1 mišinyje laikytų žuvų audiniuose, kuriuose Zn (o taip pat ir Cd) kiekiai buvo didesni, nei MIX laikytose žuvyse (24 lentelė). Visuose SM*0,1 mišiniuose laikytų žuvų audiniuose Ni kiekis buvo mažesnis, nei MIX paveiktose žuvyse (išskyrus Zn*0,1 ir Cr*0,1 mišiniuose laikytų žuvų kepenyse). Audiniuose sukaupto Cd kiekis taip pat buvo mažesnis Ni*0,1 ir Pb*0,1 mišiniuose laikytose žuvyse, lyginant su MIX mišiniu. Vienodų kryptių Ni ir Cd kiekio pokytis (sumažėjimas) visuose audiniuose nustatytas žuvis eksponuojant, atitinkamai, Cd*0,1 ir Ni*0,1 mišiniuose. Priešingų kryptių Cr ir Zn kiekio pokytis audiniuose nustatytas žuvis eksponuojant, atitinkamai, Zn*0,1 ir Cr*0,1 mišiniuose. Toks pats dėsningumas nustatytas ir tarp Cd bei Cr, žuvis eksponuojant, atitinkamai, Cr*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose.

3.2.3.4 Rezultatų palyginimas

Lyginant su MIX mišinyje laikytomis žuvimis, tam tikrais SM*0,1 mišiniais paveiktose skirtingų rūšių žuvyse buvo stebimas tokio paties pobūdžio konkretaus SM kiekio pokytis (sumažėjimas arba padidėjimas) konkrečiame audinyje (25 lentelė).

Lyginant su mišiniu MIX, **visų 3-jų žuvų rūšių** konkrečiame audinyje daugeliu atvejų buvo stebimas *vienašališkas*, tik vieno iš metalų kiekio pokytis (sumažėjimas arba padidėjimas), kada kito metalo DLK mišinyje sumažinama 10 kartų (t. y., antrojo SM koncentracijos sumažinimas mišinyje nesukelia pirmojo SM kaupimosi audiniuose pokyčių). Rečiau vyko *vienodos krypties* dviejų tų pačių SM kiekio pokytis (kuomet vieno iš dviejų konkrečių metalų DLK mišinyje sumažinus 10 kartų, kito metalo kaupimas žuvų audiniuose taip pat sumažėja) arba *priešingos krypties* dviejų tų pačių SM kiekio pokytis

(kuomet pirmojo iš dviejų konkrečių metalų DLK mišinyje sumažinus 10 kartų, antrojo SM kaupimas žuvų audiniuose sumažėja, tačiau sumažinus antrojo SM DLK mišinyje, pirmojo SM kaupimas padidėja). Daugiausiai bendrų SM kaupimosi dėsnų pasireiškė raumenyse (25 lentelė).

25 lentelė. Metalų kiekio pokytis, atsikartojantis 3-ju skirtingų žuvų rūšių (*S. salar*, *R. rutilus*, *P. fluviatilis*) žiaunose, kepenyse, inkstuose ir raumenyse, veikiant daugianariais metalų SM*0,1 mišiniais, kuriuose tam tikro metalo DLK sumažinta 10 kartų. (↓ – vienašališkas SM kiekio sumažėjimas; ↑ – vienašališkas SM kiekio padidėjimas; ↓↓ – vienodos krypties SM kiekių pokytis; ↓↑ – priešingos krypties SM kiekių pokytis).

Lyginama su MIX mišiniu					
ŽIAUNOSE			KEPENYSE		
SM mišinys	SM	SM kiekio pokytis	SM mišinys	SM	SM kiekio pokytis
Cu*0,1	Ni	↓	Zn*0,1	Cu	↓↑
Cu*0,1	Cr	↓↓	Zn*0,1	Cr	↓
Ni*0,1	Zn	↓	Cu*0,1	Cr	↓
Ni*0,1	Cd	↓	Cu*0,1	Pb	↓
Cr*0,1	Ni	↓↑	Cr*0,1	Cd	↑
Cd*0,1	Zn	↓	Pb*0,1	Zn	↓
Cd*0,1	Cr	↓	Pb*0,1	Ni	↓
Cd*0,1	Pb	↓	Pb*0,1	Cr	↓
			Pb*0,1	Cd	↓
RAUMENYSE			INKSTUOSE		
Zn*0,1	Cu	↓	Zn*0,1	Cu	↓
Zn*0,1	Ni	↓	Cu*0,1	Ni	↓
Zn*0,1	Pb	↓	Cu*0,1	Pb	↓
Zn*0,1	Cd	↓	Cr*0,1	Ni	↓
Cu*0,1	Ni	↓↑	Pb*0,1	Ni	↓
Cu*0,1	Pb	↓			
Cu*0,1	Cd	↓↑			
Ni*0,1	Pb	↓↓			
Ni*0,1	Cd	↓			
Cr*0,1	Ni	↓			
Cr*0,1	Pb	↓↓			
Cd*0,1	Pb	↑			

Skirtingų žuvų rūšių žiaunose buvo stebimas Cr ir Cu kiekio sumažėjimas, veikiant Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais, atitinkamai (vienodos krypties pokytis). Žiaunose taip pat buvo stebimas Cr akumuliacijos padidėjimas, veikiant Ni*0,1 mišiniu, tačiau veikiant Cr*0,1 mišiniu, Ni kiekis reikšmingai sumažėjo (priešingų krypties pokytis). Kepenyse taip pat išryškėjo

metalų priešingos krypties pokytis, kurio metu Cu kiekis sumažėjo, veikiant žuvis Zn*0,1 mišiniu, tačiau veikiant Cu*0,1, Zn kiekis jau buvo linkęs padidėti. Inkstuose nustatytas tik vienašališkas metalų kiekių pokytis (sumažėjimas) veikiant žuvis tam tikru SM*0,1 mišiniu. Raumenyse nustatytas *vienodų kryptių* Pb kiekio pokytis, veikiant žuvis Ni*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais, o *priešingų kryptių* pokytis nustatytas Ni ir Cd, eksponuojant skirtingas žuvų rūšis Cu*0,1 mišinyje (25 lentelė).

Dėsninga yra ir tai, kad mažesni Ni kiekiai susikaupia Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniuose laikytų visų 3-jų rūšių žuvų *visuose audiniuose* (išskyrus kepenyse). Taip pat, Ni akumuliacija yra reikšmingai mažesnė bet kuriame iš SM*0,1 mišinių laikytų *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* žiaunose bei raumenyse lyginant su MIX laikytų žuvų atitinkamais audiniais (žr. 22, 24 lentelę).

Tai, kad SM kaupimuisi žuvų audiniuose reikšmingos įtakos turi skirtingų metalų koncentracijų santykis mišinyje, iliustruoja 26-oje lentelėje pateiktos SM kiekių skirtinguose mišiniuose laikytų žuvų audiniuose sekos. Lentelėje pirmoje sekos pozicijoje nurodomas SM mišinys, kuriame laikytos konkrečios rūšies žuvis audinyje sukauptė daugiausia konkretaus metalo, o paskutinėje – mišinys, kuriame laikytose žuvyse to paties metalo kiekiai buvo mažiausi.

Kaip jau buvo minėta, analizuojant SM kaupimąsi skirtingų rūšių žuvų audiniuose, didžiausi metalų kiekiai nebūtinai susikaupia tų žuvų audiniuose, kurios buvo laikomos mišinyje su nesumažintomis SM koncentracijomis (MIX). Daugeliu atvejų, mišinių sekose MIX neužima pirmos pozicijos. O tai patvirtina, kad mišiniuose (SM*0,1), kuriuose vieno iš metalų DLK buvo sumažinta 10 kartų, kurio nors iš metalų kaupimasis žuvų audiniuose gali būti skatinamas.

Taip pat, sumažinus konkretaus metalo DLK 10 kartų mišinyje, ne visada buvo nustatytas mažesnis to paties metalo kaupimasis audinyje, lyginant su kiekiais, sukauptais kituose SM mišiniuose eksponuotų žuvų tame pat audinyje (žr. 26 lentelę, išryškinta raudonai). **Tai rodo, kad žuvų audiniai, esant kitiems metalams mišinyje, linkę konkretų metalą vis tiek kaupti, net jei to**

metalo koncentracija mišinyje yra sąlyginai maža. Pavyzdžiui, Cd kiekis, sukauptas Cd*0,1 mišinyje (t. y., mišinyje su 10 kartu sumažinta Cd koncentracija) laikytų žuvų raumenyse nebuvo reikšmingai mažesnis nei žuvų, laikytų MIX mišinyje. Tačiau kituose audiniuose, atvirksčiai, mažiausi Cd kiekiai susikaupė po ekspozicijos Cd*0,1 mišiniu.

26 lentelė. Metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd; lentelės pirmame stulpelyje nurodyti paryškintu ir pabrauktu šriftu) kaupimasis skirtingų žuvų rūšių audiniuose, veikiant skirtingo tipo daugianariais metalų mišiniais (SM*0,1 mišiniai lentelėje nurodyti pasviruoju šriftu, be „*0,1“ simbolio). Pirmoje sekos pozicijoje nurodomas SM mišinys, kuriame laikytos konkrečios rūšies žuvys audinyje sukauptė daugiausia konkretaus metalo, o paskutinėje – mišinys, kuriame laikytose žuvyse to paties metalo kiekiai buvo mažiausi.

juoda žvaigždutė (*) žymi SM*0,1 mišinį, kuriame laikytų žuvų audiniuose susikaupė reikšmingai didesnis konkretaus metalo kiekis, lyginant su kiekiu, susikaupusiu MIX laikytų žuvų audiniuose (dvifaktorinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$);

raudona žvaigždutė (*) žymi SM*0,1 mišinį, kuriame laikytų žuvų audiniuose susikaupė reikšmingai didesnis to paties metalo (kurio DLK mišinyje sumažinta 10 kartų; nurodyta raudonu šriftu) kiekis lyginant su kiekiu, susikaupusiu sekos paskutinėje vietoje nurodytame mišinyje laikytų žuvų audiniuose (dvifaktorinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$).

	SM, mg/kg	<i>S. salar</i>	<i>R. rutilus</i>	<i>P. fluviatilis</i>
		Metalų mišiniai		
ŽIAUNOS	<u>Zn</u>	MIX>Cu->Ni->Pb->Cr->Zn->Cd-	Pb-*>MIX>Cu->Cr->Cd->Zn->Ni-	Cr->Cu->MIX>Cd->Ni->Pb->Zn-
	<u>Cu</u>	Ni->Cd->MIX>Cu->Pb->Cr->Zn-	Pb->Cd->Zn->Ni->MIX>Cr->Cu-	MIX>Pb->Cd->Zn->Ni->Cr->Cu-
	<u>Ni</u>	Cd-*>Zn->Pb->MIX>Cr->Cu->Ni-	*MIX>Cr->Ni-*>Zn->Pb->Cu->Cd-	*MIX>Cr->Ni-*>Zn->Cu->Pb->Cd-
	<u>Cr</u>	Ni-*>Zn->MIX>Cu->Cd->Pb->Cr-*	Ni-*>Pb-*>Zn->MIX>Cd->Cr-*>Cu-	Ni-*>MIX>Zn->Cd->Cu->Cr->Pb-
	<u>Pb</u>	Zn->MIX>Cd->Pb->Ni->Cu->Cr-	MIX>Pb-*>Zn->Cr->Ni->Cu->Cd-	Ni-*>Cr-*>Zn-*>Cu->MIX>Pb->Cd-
	<u>Cd</u>	Pb->MIX>Cu->Cr->Ni->Zn->Cd-*	Cr-*>Zn->Cu->Pb->MIX>Ni->Cd-*	Zn-*>Cr-*>Cu-*>MIX>Ni->Pb->Cd-*
KEPENYS	<u>Zn</u>	Cu-*>MIX>Zn-*>Ni->Cd->Pb->Cr-	Ni->Cd->Cu->MIX>Pb->Zn->Cr-	Cr->Cu->MIX>Cd->Ni->Pb->Zn-
	<u>Cu</u>	Cr-*>Ni-*>MIX>Zn->Cu->Pb->Cd-	Pb->MIX>Zn->Cd->Cu-*>Ni->Cr-	Cd-*>Pb-*>Ni-*>MIX>Zn->Cr->Cu-
	<u>Ni</u>	Cd->MIX>Zn->Ni-*>Cr->Pb->Cu-	Cu-*>Zn-*>Cr->MIX>Cd->Ni->Pb-	Cr->Zn->MIX>Ni->Pb->Cd->Cu-
	<u>Cr</u>	Cd-*>Ni->MIX>Zn->Pb->Cu->Cr-	*MIX>Ni->Cu->Zn->Cr-*>Pb->Cd-	*MIX>Cr-*>Ni->Zn->Cu->Pb->Cd-
	<u>Pb</u>	Cd-*>Ni->MIX>Zn->Pb->Cr->Cu-	*MIX>Cd->Cr->Zn->Cu->Pb->Ni-	Cr-*>Zn-*>Ni->MIX>Pb->Cu->Cd-
	<u>Cd</u>	Cr-*>Ni->MIX>Pb->Zn->Cu->Cd-	Zn->Cu->Cr->Ni->MIX>Pb->Cd-	Zn-*>Cr->MIX>Cu->Ni->Pb->Cd-
INKSTAI	<u>Zn</u>	MIX>Cd->Pb->Ni->Zn->Cu->Cr-	Cu-*>Cr-*>Ni-*>Pb->Cd->MIX>Zn-	Cu-*>Cr-*>MIX>Cd->Zn->Pb->Ni-
	<u>Cu</u>	Pb->Cd->MIX>Ni->Cr->Cu->Zn-	Ni->MIX>Cr->Pb->Zn->Cd->Cu-	Cr-*>MIX>Zn->Ni->Cd->Pb->Cu-
	<u>Ni</u>	Cd-*>MIX>Pb->Cr->Ni-*>Zn->Cu-	Zn-*>MIX>Cd->Cu->Cr->Pb->Ni-	*MIX>Cr->Zn->Pb->Cu->Ni-*>Cd-
	<u>Cr</u>	Ni-*>MIX>Pb->Cd->Zn->Cu->Cr-*	Cu-*>Zn->Cd->Pb->MIX>Ni->Cr-	*MIX>Cd->Ni->Cu->Cr->Zn->Pb-
	<u>Pb</u>	Cd->MIX>Pb-*>Ni->Cr->Zn->Cu-	Cr->Zn->MIX>Cu->Pb->Ni->Cd-	Cd-*>Ni-*>MIX>Cr->Pb->Cu->Zn-
	<u>Cd</u>	Ni-*>Pb->MIX>Cr->Zn->Cu->Cd-	Cr->Cu->Ni->Zn->Pb->MIX>Cd-*	Zn->Cr->MIX>Ni->Pb->Cu->Cd-
RAUMENYS	<u>Zn</u>	Cd->Pb->MIX>Cu->Ni->Zn->Cr-	Ni->Cu->MIX>Zn->Pb->Cd->Cr-	Cr->MIX>Cu->Cd->Pb->Zn->Ni-
	<u>Cu</u>	Ni->Cd->MIX>Cu->Pb->Cr->Zn-	Ni->Cr->Cd->Pb->MIX>Cu->Zn-	Cd->Ni->MIX>Cr->Pb->Zn->Cu-
	<u>Ni</u>	Cd-*>MIX>Cr->Cu->Ni->Pb->Zn-	*MIX>Cr->Cd->Ni-*>Zn->Pb->Cu-	*MIX>Cd->Cr->Ni->Zn->Cu->Pb-
	<u>Cr</u>	Cu-*>MIX>Cd->Ni->Zn->Cr->Pb-	Ni-*>Zn->Cd->MIX>Cu->Pb->Cr-	MIX>Ni->Zn->Cd->Pb->Cu->Cr-
	<u>Pb</u>	Cd-*>MIX>Zn->Pb-*>Cr->Cu->Ni-	Cd->MIX>Cu->Zn->Cr->Pb->Ni-	Cd->MIX>Cr->Pb->Zn->Ni->Cu-
	<u>Cd</u>	Pb->MIX>Cd->Ni->Zn->Cr->Cu-	MIX>Cd->Zn->Cu->Pb->Cr->Ni-	Cr->MIX>Zn->Cu->Pb->Cd->Ni-

Taip pat esama dėsningumo, kad Cr kiekiai žiaunose ir Pb kiekiai raumenyse buvo reikšmingai didžiausi žuvyse, laikytose, atitinkamai, Ni*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose. Gana didelė tikimybė, kad tarp Cr-Ni ir Pb-Cd gali egzistuoti sąveika, kuri sustiprina vieno metalo kaupimąsi žuvų audinyje, sumažinus kito metalo koncentraciją mišinyje.

Tačiau kai kurių SM kaupimasis tam tikruose audiniuose atitiko dėsningumus, kurių būtų galima tikėtis, laikant žuvis mišiniuose, kuriuose tų metalų koncentracija yra didžiausia. Pavyzdžiui, paveikus žuvis MIX mišiniu, reikšmingai didžiausi Zn kiekiai susikaupė *S. salar* žiaunose ir inkstuose, Cu – *P. fluviatilis* žiaunose; Ni – žiaunose, raumenyse (*R. rutilus* ir *P. fluviatilis*), inkstuose (*P. fluviatilis*), Cr – kepenyse (*R. rutilus* ir *P. fluviatilis*), inkstuose ir raumenyse (*P. fluviatilis*); Pb – *R. rutilus* žiaunose ir kepenyse; Cd – *R. rutilus* raumenyse (26 lentelė).

Eksponuojant skirtingas žuvų rūšis daugianariuose SM mišiniuose, metalai žuvų audiniuose kaupėsi gana skirtingai (27 lentelė). *R. rutilus* buvo linkusi reikšmingai daugiau kaupti SM nei *S. salar* ir *P. fluviatilis*. Pateiktoje lentelėje matyti, kad visaėdės *R. rutilus* audiniuose kaupėsi didesni Zn, Cu, Ni, o plėšriosios žuvyse (*S. salar* ir *P. fluviatilis*) – Pb, Cd kiekiai. Chromą audiniuose apytiksliai vienodai kaupė tiek visaėdės, tiek plėšriosios žuvys. Nors *R. rutilus* audiniuose Cd visumoje kaupė mažiau nei *S. salar* ir *P. fluviatilis*, tačiau, veikiant MIX; Zn*0,1; Cu*0,1 ir Cd*0,1 mišiniais, *R. rutilus* raumenyse sukaupti Cd kiekiai yra reikšmingai didesni, nei kitų 2 rūšių raumenyse. *R. rutilus* taip pat reikšmingai daugiau sukauptė Pb kepenyse, veikiant MIX, Cu*0,1 ir Cd*0,1 mišiniais. Žiaunose kuojos reikšmingai daugiau kaupė Pb, veikiant MIX, Zn*0,1 ir Pb*0,1. *R. rutilus* reikšmingai daugiau visuose audiniuose sukauptė Ni, eksponuojant žuvis MIX, Zn*0,1 ir Cr*0,1 mišiniuose, o Cu – veikiant Zn*0,1 mišiniu. Taip pat 27-oje lentelėje matyti, kad *R. rutilus* audiniuose daugiau kaupė Zn, veikiant Ni*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniais.

Veikiant Ni*0,1; Cr*0,1 ir Pb*0,1 mišiniais, *S. salar* audiniuose, lyginant su kitų rūšių žuvimis, reikšmingai daugiau susikaupė Cd. Atitinkamai, Ni*0,1

ir Cr*0,1 paveikti *P. fluviatilis* audiniuose sukauptė reikšmingai daugiau Pb, nei kitų rūšių žuvys. Taip pat daugiau Cd susikaupė MIX, Zn*0,1; Cu*0,1; Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniuose laikytuose ešerių kepenyse.

27 lentelė. Metalų kaupimosi palyginimas skirtingų žuvų rūšių (kuojos (K), ešerio (E), lašišos (L)) audiniuose, veikiant žuvis daigianariais SM mišiniais.

SM mišinys	Audinys	Zn	Cu	Ni	Cr	Pb	Cd
Kontrolė	Žiaunos	K	K	E	L	K	L
	Kepenys	L	K	E	E	K	E
	Inkstai	K	K	E	L	E	L
	Raumenys	K	K	L	L	K	L
MIX	Žiaunos	K	E	K	L	K	L
	Kepenys	L	K	K	K	K	E
	Inkstai	L	K	K	E	E	L
	Raumenys	K	L	K	K	L	K
Zn*0,1	Žiaunos	K	K	K	L	K	E
	Kepenys	L	K	K	K	E	E
	Inkstai	K	K	K	L	K	L
	Raumenys	K	K	K	K	L	K
Cu*0,1	Žiaunos	K	K	L	L	E	L
	Kepenys	L	K	K	K	K	E
	Inkstai	K	K	K	K	K	L
	Raumenys	K	L	L	K	K	K
Ni*0,1	Žiaunos	K	L	K	K	E	L
	Kepenys	K	K	L	K	E	L
	Inkstai	K	K	E	L	E	L
	Raumenys	K	L	K	K	K	L
Cr*0,1	Žiaunos	K	K	K	K	E	L
	Kepenys	E	K	K	E	E	L
	Inkstai	K	E	K	L	E	L
	Raumenys	E	K	K	L	E	L
Pb*0,1	Žiaunos	K	K	L	K	K	L
	Kepenys	K	K	L	K	K	E
	Inkstai	K	K	E	L	E	L
	Raumenys	K	K	L	K	E	L
Cd*0,1	Žiaunos	K	E	L	L	L	L
	Kepenys	K	K	L	L	K	E
	Inkstai	K	L	K	L	E	L
	Raumenys	K	L	K	K	L	K

Pastaba: skirtingomis spalvomis (rožinė – kuojos; geltona – lašiša; žalia – ešeris) nuspalvinti plotai žymi reikšmingai (dvifaktorišinė ANOVA, post-hoc Bonferroni testai, $p < 0,05$) didesnę SM kiekį konkrečios rūšies žuvų audiniuose, lyginant su kitų rūšių žuvimis.

Aukščiau išdėstyta informacija patvirtina, kad SM kaupimasis audiniuose labai priklauso tiek nuo žuvų rūšies bei audinio, tiek nuo kaupiamo SM bei SM koncentracijos daugianariame mišinyje, kuriame eksponuojamos žuvis.

3.2.3.5 Rezultatų aptarimas

Daugelyje ankstesniu laikotarpiu vykdytų tyrimų, pagrindinis dėmesys buvo skiriamas atskiro metalo toksinio poveikio žuvims įvertinimui. Tačiau gamtinėje aplinkoje žuvis vienu metu yra veikiamos daugianariais SM mišiniais, kurie dėl galimų SM sąveikų mišinyje (adityvumo, sinergizmo, antagonizmo) gali tapti toksiškesniais nei atskiri metalai (Borgmann et al., 2008). Mišinį sudarantys komponentai sąveikauja, kiekybiškai padidindami ar sumažindami vienas kito akumuliaciją organizme. Dėl to kartu pakinta ir bendras mišinio toksiškumas, kuris gali būti stipresnis arba silpnesnis nei buvo prognozuota (Heys et al., 2016).

Šio tyrimo metu siekta nustatyti metalų kaupimosi dėsningumus skirtingų žuvų rūšių audiniuose, veikiant skirtingų kombinacijų daugianariais metalų mišiniais, kuriuose SM koncentracijos yra artimos gamtinėje aplinkoje esančioms koncentracijoms. Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad eksponuojant žuvis daugianariuose SM*0,1 mišiniuose, kuriuose vieno iš metalų koncentracija buvo sumažinta 10 kartų, tarp SM galimai vyko sąveikos, lėmusios didesnę ar mažesnę metalų akumuliaciją žuvų audiniuose. Lyginant su mišiniu MIX, skirtingų žuvų rūšių audiniuose dažniau buvo nustatytas *vienašališkas*, tik vieno iš metalų kiekio pokytis (sumažėjimas arba padidėjimas), kada kito metalo DLK mišinyje sumažinama 10 kartų (t. y., antrojo SM koncentracijos sumažinimas mišinyje nesukelia pirmojo SM kaupimosi audiniuose pokyčių). Rečiau vyko *vienodos krypties* dviejų tų pačių SM kiekio pokytis (kuomet vieno iš dviejų konkrečių metalų DLK mišinyje sumažinus 10 kartų, kito metalo kaupimas žuvų audiniuose taip pat sumažėja) arba *priešingos krypties* dviejų tų pačių SM kiekio pokytis (kuomet pirmojo iš dviejų konkrečių metalų DLK mišinyje sumažinus 10 kartų, antrojo SM kaupimas žuvų audiniuose sumažėja, tačiau sumažinus antrojo SM DLK

mišinyje, pirmojo kaupimas padidėja). Analizuojant kitų autorių darbus matyti, kad SM sąveikos dažnai tiriamos tarp dviejų ar trijų metalų, veikiant žuvis atskirais metalais ir jų mišiniu (Driessnack et al., 2016, 2017; Duran et al., 2015; Winter et al., 2012; McGeer et al., 2007; Eroglu et al., 2005; Kargin and Çogun, 1999; Pelgrom et al., 1995). Bandyto koncentracijos parenkamos vienodos tiek žuvis eksponuojant atskirais metalais, tiek jų mišiniu ir lyginamas metalų akumuliacijos lygis žuvų audiniuose. Dažnai tyrimo metu nustatoma sąveika tarp metalų. Tačiau yra keletas darbų, kurių metu buvo nustatyta tik vienašališkas, vieno iš metalų pokytis. Driessnack et al. (2017) analizavo sąveiką tarp Cd ir Zn mišinyje. Cinkas reikšmingai slopino Cd akumuliaciją žiaunose ir kepenyse, tačiau Zn kiekis audiniuose nemažėjo esant Cd (vienašališkas SM kiekio pokytis). McGeer et al. (2007) tyrė metalų absorbciją žiaunose, veikiant žuvis Cu + Cd mišiniu. Nustatyta, kad Cu silpnina Cd akumuliaciją žiaunose, tačiau Cu absorbcija žiaunose nepakinta, esant Cd mišinyje. Pelgrom et al. (1995) taip pat tyrė sąveiką tarp Cd ir Cu veikdami žuvis atskirais metalais ir jų mišiniu. Nustatė vienašališką SM kiekio pokytį tarp šių metalų. Veikiant mišiniu, Cd kiekis audiniuose mažėjo, priešingai nei veikiant Cd atskirai. Tačiau Cd neturėjo įtakos Cu kaupimuisi žuvis veikiant Cd + Cu mišiniu.

Taip pat šio tyrimo metu, pasireiškė keletas vienodų arba priešingų kryptų SM kiekių pokyčių žuvų audiniuose. Žemiau išsamiau analizuojami šie SM kiekių pokyčiai.

Veikiant tris skirtingas žuvų rūšis Cu*0,1 mišiniu, Cr kiekis, sukauptas tirtų žuvų žiaunose buvo mažesnis (reikšmingai mažesnis *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* žiaunose), lyginant su kiekiu, MIX mišinyje laikytų žuvų žiaunose. Atitinkamai, veikiant Cr*0,1 mišiniu, žiaunose sukauptas Cu kiekis taip pat buvo mažesnis, nei MIX paveiktose žuvyse (vienodų kryptų SM kiekių pokytis) (žr. 25 lentelę). Šis reiškinys buvo stebimas visų trijų žuvų rūšių žiaunose, tačiau Cu ir Cr kiekių skirtumai, lyginant su kiekiais MIX laikytų žuvų žiaunose, ne visada buvo statistiškai reikšmingi. Kita vertus, visų trijų rūšių žuvų žiaunose pasireiškianti vienoda Cu ir Cr kaupimosi pokyčio

tendencija veikiant, atitinkamai Cr*0,1 ir Cu*0,1* mišiniais, leidžia daryti prielaidą, kad tarp šių metalų gali egzistuoti sinergetinė sąveika. Mokslinės literatūros duomenimis, sąveika tarp Cu-Cr, veikiant žuvis daugianariu SM mišiniu, iki šiol nebuvo tirta.

Lyginant su mišiniu MIX paveikta žuvų grupė, Cr kiekis žuvų žiaunose buvo reikšmingai *didesnis* Ni*0,1 mišinyje laikytose žuvyse, tačiau Ni kiekis buvo reikšmingai *mažesnis* Cr*0,1 mišinyje laikytose žuvyse (priešingų krypčių SM kiekių pokytis) (žr. 25 lentelę). Tai rodo, kad tarp šių metalų egzistuoja sąveika, tačiau tik priešingų krypčių (SM kiekis sumažėjo/padidėjo). Šis rezultatas neatitinka kitų autorių tyrimų (Palaniappan and Karthikeyan, 2009; Van Hoof and Nauwelaers, 1984), kurių metu buvo nustatyta stipri sinergetinė sąveika tarp šių metalų, rezultatų. Tačiau reikia paminėti, kad žuvis (*C. mrigala*, *R. rutilus*) minėtuose tyrimuose buvo veikiamos tik binariniu mišiniu (Ni + Cr).

Būtina akcentuoti tai, kad lyginant su mišiniu MIX, Ni reikšmingai mažesnis kaupimasis buvo nustatytas trijų skirtingų žuvų rūšių žiaunose, inkstuose ir raumenyse, veikiant Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais, tačiau Cr ir Cu kiekis žuvų žiaunose ir raumenyse buvo linkęs padidėti po poveikio Ni*0,1 mišiniu. Tai rodo, kad tarp Ni-Cu ir Ni-Cr gali egzistuoti tik vienakryptė sąveika – sinergija. Skirtingų žuvų rūšių inkstuose taip pat buvo nustatytas tik vienašališkas Ni kiekio pokytis – sumažėjimas veikiant žuvis Cu*0,1 ir Cr*0,1 mišiniais, lyginant su mišiniu MIX. Mūsų duomenimis, toks reiškinys iki šiol nebuvo aprašytas.

Priešingų krypčių Zn-Cu kiekių pokytis nustatytas trijų skirtingų žuvų rūšių kepenyse. Veikiant žuvis Zn*0,1 mišiniu, buvo sukaupiamas mažesnis Cu kiekis, tačiau veikiant Cu*0,1 mišiniu, kepenyse sukaupiamas Zn kiekis, atvirkščiai, buvo didesnis. Kaip žinoma, Cu ir Zn yra būtinieji elementai, kurie dalyvauja medžiagų apykaitos veikloje (Bury et al., 2003). Manoma, kad antagonistinė sąveika tarp šių metalų atsiranda, dėl šių elementų cheminio panašumo, vienodo valentingumo, vienodų jungimosi vietų žiaunų membranoje bei vienodų baltymų-pernešėjų (Pelgrom et al., 1995; Schjolden et

al., 2007). Autorių (Nadella et al., 2007; Ojo et al., 2009; Qiu and Hogstrand, 2005) teigimu, dėl Zn ir Cu vienodų baltymų-pernešėjų per žiaunų membraną, Zn ir Cu linkę slopinti vienas kito patekimą į Vaivorykštinio upėtakio organizmą. Mano tyrimo rezultatai tik iš dalies sutampa su šių autorių tyrimo rezultatais (kaip minėta, daugianariame SM mišinyje sumažinus Cu koncentraciją, žuvų kepenyse sukaupiamas didesnis Zn kiekis, tačiau Zn kiekio sumažinimas mišinyje sukelia priešingą Cu kiekio pokytį (Cu akumuliacija sumažėja)).

Veikiant žuvis tam tikru SM*0,1 mišiniu, *S. salar*, *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* inkstuose buvo stebimas tik vienašališkas metalų kiekio pokytis – sumažėjimas, lyginant su mišiniu MIX. Taip pat inkstuose nustatyta mažiausiai vienodų SM kaupimosi dėsningumą, kurie buvo būdingi 3-ims skirtingoms žuvų rūšims (žr. 25 lentelę). Tai gali būti susiję su inkstų atliekamomis funkcijomis organizme. Inkstai atsakingi už šlapimo gaminimą bei skysčių šalinimą iš organizmo, kuris veikia kaip toksikantų šalinimo mechanizmas (Ojeda et al., 2003).

Gamtinių ir eksperimentinių tyrimų duomenimis, žuvų raumenyse, lyginant su kitais audiniais, susikaupia mažiausiai SM (Jeziarska and Witeska, 2006; Guérin et al., 2011; Merciai et al., 2014), tačiau šio tyrimo metu raumenyse buvo nustatyta daugiausia specifinių, visoms trims skirtingoms žuvų rūšims būdingų, SM kiekių pokyčių. Žuvų raumenyse nustatytas priešingų kryptių Cd-Cu ir Ni-Cu kiekių pokytis. Vario ir Cd kiekių pokytis veikiant, atitinkamai, Cd*0,1 ir Cu*0,1 mišiniais atitinka McGeer et al. (2007) ir Pelgrom et al. (1995) tyrimo, kurio metu nebuvo nustatyta sąveika tarp šių metalų, rezultatus. Taip pat, sumažinus Cu koncentraciją mišinyje, Ni kiekis žuvų raumenyse sumažėjo (lyginant su MIX mišinyje laikytomis žuvimis) ir tai sutampa su kitų autorių tyrimų rezultatais (Brix et al., 2016; Komjarova and Blust 2009a). Tačiau sumažinus Ni koncentraciją mišinyje, Cu kiekis raumenyse jau buvo linkęs didėti (priešingų kryptių SM kiekių pokytis). Tokią pačią sąveiką nustatė Komjarova and Blust (2009a), tačiau – tik *Danio rerio* žiaunose.

Taip pat raumenyse buvo nustatytas vienodų kryptių Ni-Pb ir Cr-Pb kiekių pokytis (sumažėjimas). Komjarova ir Blust (2009a) tyrė galimas sąveikas tarp 5 metalų (Pb, Cd, Cu, Ni, Zn), veikiant *Danio rerio* daugianariu SM mišiniu. Rezultatai parodė, kad Pb kaupimasis visame kūne tiesiogiai didėjo, didinant kitų metalų koncentracijas mišinyje. Tyrimų, kurių metu būtų analizuojama sąveika tarp Cr ir Pb, yra mažai. Ghosh et al. (2007) veikė *L. rohita* binariniu Cr + Pb mišiniu ir Cr, Pb atskirai. Tačiau nustatė priešingų kryptių sąveiką. Pb kiekis audiniuose buvo linkęs mažėti, esant Cr mišinyje, tačiau Cr kiekis didėjo, esant Pb mišinyje.

Tyrimo rezultatus gana sudėtinga palyginti su kitų autorių tyrimų rezultatais. Daugelis pastarųjų tyrimų atlikti pasirenkant atskirus metalus, binarinius, rečiau – trinarus metalų mišinius bei naudojant itin aukštas koncentracijas, kurios negali atspindėti realių, gamtoje vykstančių procesų. Priešingai nei daugelyje atliktų darbų, šio tyrimo metu SM kaupimosi dėsniumai žuvų audiniuose buvo tiriami žuvis veikiant daugianariais metalų mišiniais ir koncentracijas tirpaluose sumažinant 10 kartų, o ne padidinant. Tuo tarpu daugumoje iki šiol vykdytų tyrimų, SM elgesys mišiniu veikiant žuvis analizuotas nekeičiant SM koncentracijų (Duran et al., 2015) arba didinant SM koncentracijas mišinyje (Brix et al., 2016; Kargin and Çogun, 1999; Pelgrom et al., 1995). Gauti šio darbo tyrimo rezultatai parodė, kad sumažinus tam tikro SM koncentraciją iki gamtinei aplinkai artimos koncentracijos ir tarsi SM eliminavus iš mišinio, žuvų audiniuose buvo sukaupti reikšmingai didesni SM kiekiai, nei po ekspozicijos mišiniu MIX, kuriame nei vieno iš SM koncentracija nebuvo sumažinta (žr. 3.2.3.4 poskyrį; 26 lentelę). Eksponuojant žuvis SM*0,1 mišiniuose, reikšmingai didesni kai kurių SM kiekiai *S. salar* audiniuose susikaupė 14 atvejų iš 168; *R. rutilus* – 12 iš 168; *P. fluviatilis* – 18 atvejų iš 168 lyginant su mišiniu MIX. Tai rodo, kad reikšmingas vieno iš SM koncentracijos sumažinimas mišinyje skatina intensyvesnę kai kurių kitų metalų kaupimąsi audiniuose.

Dėl tos pačios priežasties, konkretaus metalo koncentracijos sumažinimas mišinyje nebūtinai nulemia to paties metalo reikšmingai mažesnę kaupimąsi

audiniuose, lyginant su sukauptu kiekiu žuvyse, eksponuotose kituose mišiniuose su sumažinta kurio nors kito metalo koncentracija (žr. 3.2.3.4 poskyrį; 26 lentelę išryškinta raudonai). Tai ypač buvo būdinga Ni, Pb ir Cd kaupimuisi. Veikiant žuvis, atitinkamai, Ni*0,1, Pb*0,1 ir Cd*0,1 mišiniais, Ni, Pb (daugelyje žuvų audinių) ir Cd (tik raumenyse) buvo sukaupiama ne ką mažiau, nei paveikus kitais SM*0,1 mišiniais. Ir atvirkščiai: vieno iš metalų koncentracijos sumažinimas mišinyje kai kuriais atvejais tiek sumažina kito, konkretaus metalo kaupimąsi žuvų audiniuose, kad pastarojo kiekis netgi tampa reikšmingai mažesniu nei kiekis žuvų audiniuose, eksponuotų mišiniuose su sumažinta šio, konkretaus metalo koncentracija (pvz., Ni kiekis ešerių, eksponuotų Pb*0,1 mišinyje žiaunose yra reikšmingai mažesnis, nei Ni*0,1 mišinyje eksponuotų ešerių žiaunose; žr. 21 pav.).

Šiuo metu sukaupta nemažai duomenų apie SM bioakumuliaciją žuvų audiniuose iš gamtinių vandens telkinių, tačiau tarprūšiniai žuvų skirtumai, kurie gali turėti įtakos metalo kaupimuisi audiniuose, vis dar ištirti nepakankamai. Yousafzai et al. (2010) tyrė Zn, Ni, Cr, Cu, Cd ir Pb akumuliaciją gėlavandenių plėšriųjų (*Wallago attu*) ir visaėdžių (*Labeo dyocheilus*) žuvų audiniuose, atsižvelgiant į jų skirtingus maitinimosi įpročius. Tyrimo rezultatai parodė, kad visaėdės žuvis tirtuose audiniuose – odoje, žiaunose, žarnyne, kepenyse ir raumenyse sukaupė daugiau metalų (išskyrus Pb) (43 %, 36 %, 63 %, 105 %, 86 % atitinkamai), nei plėšriosios žuvis. Autoriai teigia, kad reikia papildomų tyrimų, norint išsiaiškinti Pb kaupimosi ir šalinimo mechanizmus organizme. Tačiau daro prielaidą, kad Pb šalinimas iš plėšriųjų žuvų organizmo vyksta lėčiau, nei iš visaėdžių. Jia et al. (2017) taip pat nustatė, kad visaėdės žuvis (*C. auratus*, *S. curriculum*) linkusios kaupti būtinuosius metalus (Cu, Fe, Mn, Zn), o plėšriosios žuvis (*P. fulvidraco*) toksiškus – As, Cd, Pb. Hashim et al. (2014) tyrė Ni, Cd, ir Pb akumuliaciją bentofaginių, visaėdžių ir plėšriųjų žuvų raumenyse, sužvejotų Kelantano upėje, Malaizijoje. Autoriai padarė išvadą, kad dėl galimai didesnės maisto įvairovės hidroekosistemoje, visaėdės žuvis sukaupia didesnę Cd ir Ni kiekį

raumenyse nei bentofagės ar plėšriosios žuvys. Šviną labiausiai kaupė plėšriosios žuvys, o mažiausiai – bentofagai.

Šio darbo rezultatai rodo panašias, tačiau netapačias tendencijas (žr. 3.2.3.4 poskyrį; 27 lentelę). Daugiausiai metalų audiniuose kaupė visaėdė *R. rutilus*, mažiau – *S. salar*, mažiausiai – *P. fluviatilis*. Kuojos audiniuose labiau buvo linkusi kaupti Zn, Cu, Ni, o tik gyvūninės kilmės maistu mintančios lašišos ir ešeriai – Pb, Cd. Tačiau MIX, Zn*0,1, Cu*0,1 ir Cd*0,1 mišiniais paveiktos *R. rutilus*, raumenyse Cd sukauptė daugiau, nei plėšriosios žuvys. Chromą apytiksliai vienodai kaupė tiek *S. salar*, tiek *R. rutilus*.

Metalai labiausiai kaupėsi žuvų žiaunose, kepenyse, inkstuose, mažiausiai – raumenyse. Veikiant žuvis 7-iais daugianariais SM mišiniais, žiaunose labiausiai kaupėsi: Zn (lašiša, kuoja), Cr (lašiša, ešerys), Pb (kuoja) ir Cd (lašiša, kuoja, ešerys); kepenyse: Zn (ešerys), Cu (lašiša, kuoja, ešerys), Cr (kuoja); inkstuose: Ni (lašiša, kuoja, ešerys), Pb (ešerys); raumenyse: Pb (lašiša). Panašius metalų kaupimosi rezultatus gavo ir kiti tyrėjai, kurie teigia, kad žiaunose labiausiai linkęs kauptis Zn (Jeziarska and Witeska, 2006), Cr (Svecevičius 2007b; Ghosh and Adhikari, 2006; Palaniappan and Karthikeyan, 2009), Pb (Mager et al., 2010b) ir Cd (Vinodhini and Narayanan, 2008). Kad Zn, Cu ir Cr linkę kauptis žuvų kepenyse nurodo Cousins (1985), Harris (1991), Kamunde et al. (2001, 2002a), Atli and Canli (2003). Žiaunose didesni metalų kiekiai kaupiasi dėl sąlyginai didelio žiaunų paviršiaus ploto ir tiesioginio kontakto su išorine aplinka (Jeziarska and Witeska, 2006). Be to, žiaunos yra biotinis ligandas, gebantis absorbuoti metalų jonus iš vandens (Teien et al., 2006). Kepenys – tai detoksikacijos organas, kuris itin svarbus medžiagų metabolizme (Hinton and Lauren, 1990; Nunes et al., 2015). Inkstai, kurie atsakingi už skysčių šalinimą ir jų homeostazės palaikymą organizme (Ojeda et al., 2003) kitų tyrėju teigimu, taip pat intensyviai linkę kaupti Ni (Ptashynski and Klaverkamp, 2002; Chowdhury et al., 2008; Pane et al., 2004ab; 2005, 2006ac) ir Pb (Jeziarska and Witeska, 2006). SM mažiausiai linkę kauptis raumenyse dėl mažo metalus surišančių baltymų kiekio šiame audinyje (Allen-Gill and Martynov, 1995; Jeziarska and Witeska, 2006).

Atsižvelgiant į šio darbo tyrimo rezultatus matyti, kad veikiant žuvis daugianariais SM mišiniais, SM kaupimosi audiniuose dėsniumais, daugeliu atvejų nesutampa su dėsniumais, kurie yra nustatyti žuvis veikiant binariniais SM mišiniais. Taip pat nustatyti ir nauji, iki šiol neaprašyti kai kurių SM porų kaupimosi žuvų audiniuose pokyčiai veikiant mišiniais su sumažintomis vieno ar kito SM koncentracijomis. Todėl viso SM mišinio toksiškumas organizmui negali būti prognozuojamas vien tik pagal mišinyje esančių metalų koncentracijų atitikimą DLK, kurios absoliučia dauguma atveju yra nustatytos pagal vieno metalo keliamą toksinį poveikį. Metalų kaupimasis ir, atitinkamai, toksinis poveikis priklauso ir nuo kitų SM buvimo aplinkoje. Todėl būtina surinkti kuo daugiau informacijos apie aplinkoje paplitusių bei su buitinėmis ar pramoninėmis nuotekomis į paviršinius vandenis dažniau patenkančių sunkiųjų metalų tarpusavio vaidmenį akumuliuojantis gyvuosiuose organizmuose, bei, savo ruožtu, nulemiant vienokį ar kitokį toksinį poveikį. Tokia informacija sudarytų prielaidas kur kas tikslesnių prognostinių modelių kūrimui.

3.2.4 Metalotioneinų koncentracija žuvų audiniuose po ekspozicijos daugianariame metalų mišinyje

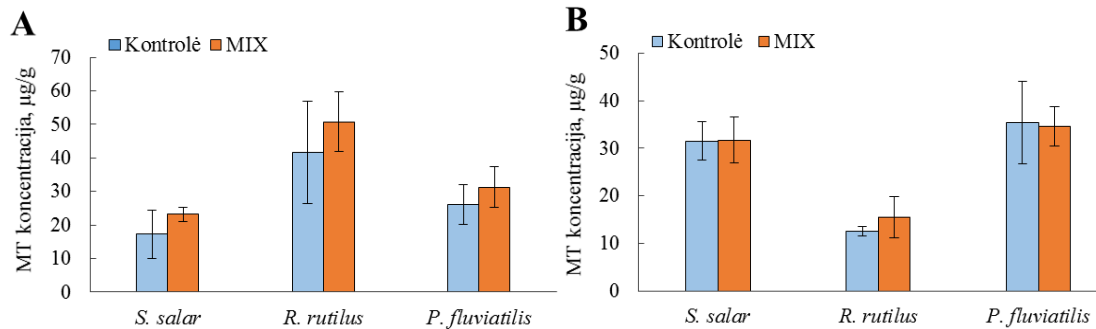
Metalotioneinų (MT) koncentracija buvo tiriama *S. salar*, *R. rutilus* ir *P. fluviatilis* kepenyse ir inkstuose. Šiam tyrimui (kontrolei ir poveikio grupei) buvo atrinkti panašaus ilgio ir svorio individai (28 lentelė).

Žuvys 14 parų buvo eksponuojamos daugianariame mišinyje MIX. Metalotioneinų koncentracija, nustatyta skirtingų žuvų rūšių kepenyse ir inkstuose po ekspozicijos MIX mišiniu, nurodyta 22 paveiksle.

MT koncentracijos reikšmingų skirtumų poveikio grupės (MIX) skirtingų rūšių žuvų audiniuose, lyginant su kontrolės žuvimis, nenustatyta (vienfaktorinė ANOVA, $p > 0,05$), t. y., MIX nesukėlė reikšmingos MT indukcijos atskirų žuvų rūšių kepenyse ir inkstuose. Tikėtina, kad MT koncentracijos skirtumo nebuvimą lėmė maža duomenų imtis.

28 lentelė. Kontrolės ir poveikio žuvų (*S. salar*, *R. rutilus*, *P. fluviatilis*) morfometriniai parametrai (vidurkis ± standartinis nuokrypis; $n = 7$).

<i>S. salar</i>		
Parametras	Kontrolė	Bandymas
Bendras ilgis (L), mm	166,9 ± 7,06	165,3 ± 2,81
Kaudalinis ilgis (l_c), mm	157,9 ± 6,69	156,5 ± 3,23
Bendras svoris (Q), g	45,2 ± 6,21	39,9 ± 2,46
Svoris be vidaus organų (q), g	38,1 ± 5,34	33,7 ± 2,12
<i>R. rutilus</i>		
Bendras ilgis (L), mm	191,4 ± 9,88	190,0 ± 11,2
Standartinis ilgis (l), mm	163,6 ± 6,27	161,4 ± 8,02
Bendras svoris (Q), g	83,0 ± 8,24	87,6 ± 14,5
Svoris be vidaus organų (q), g	70,7 ± 5,99	74,7 ± 12,2
<i>P. fluviatilis</i>		
Bendras ilgis (L), mm	180,7 ± 19,5	178,6 ± 21,9
Standartinis ilgis (l), mm	157,1 ± 15,2	155,7 ± 16,4
Bendras svoris (Q), g	63,7 ± 20,6	64,7 ± 19,2
Svoris be vidaus organų (q), g	52,8 ± 16,0	53,8 ± 15,7



22 pav. MT koncentracija (µg/g drėgno svorio) skirtingų žuvų rūšių kepenyse (A) ir inkstuose (B) (vidurkis ± standartinis nuokrypis, $n = 7$) po ekspozicijos MIX mišinyje.

Šio tyrimo metu gyvūninės kilmės maistu mintančios žuvys (*S. salar* ir *P. fluviatilis*) labiau kaupė prioritetinius toksiškus metalus – Cd (žiaunose, kepenyse, inkstuose) ir Pb (inkstuose, raumenyse) nei visaėdės *R. rutilus*, kurios labiau kaupė būtinuosius metalus – Zn, Cu ir Ni (žr. 27 lentelę). Atsižvelgiant į tapatų Cd ir Pb kaupimosi pobūdį gyvūninės kilmės maistu mintančiose žuvelyse, tolimesnei analizei *S. salar* ir *P. fluviatilis* galėtų būti apjungtos į vieną grupę taip padidinant duomenų imtį. Tačiau prieš duomenų apjungimą buvo patikrinta, ar skirtingų žuvų rūšių kepenyse MT koncentracijos nesiskiria. Nustatyta, kad MT koncentracija lašišų ir ešerių kepenyse tarpusavyje nesiskyrė tiek kontrolės, tiek poveikio grupėje. Tačiau MT koncentracija kuojos kepenyse buvo reikšmingai didesnė nei kitų žuvų rūšių kepenyse (vienfaktorinė ANOVA, $p < 0,05$). Tai patvirtina, kad kuoja

negali būti grupuojama kartu su lašiša ar ešeriu. Apjungus gyvūniniu maistu mintančias žuvis, gautas reikšmingas MT koncentracijų skirtumas ($p = 0,047$) bandymo žuvų kepenyse (MIX), lyginant su kontrole. Tai rodo, kad daugianaris mišinys MIX, kuris sudarytas iš 6-ių metalų DLK, jau indukuoja MT sintezę gyvūniniu maistu mintančių ir Cd bei Pb labiau kaupiančių *S. salar* ir *P. fluviatilis* kepenyse.

Apskaičiavus Pearson'o koreliacijas tarp MT ir SM kiekių žuvų audiniuose nustatyta, kad MT kiekis *R. rutilus* kepenyse reikšmingai koreliuoja su Zn kiekiu ($r = 0,83$; $p = 0,022$). Šis ryšys galėjo atsirasti dėl to, kad *R. rutilus*, lyginant su *S. salar* ir *P. fluviatilis*, audiniuose buvo linkusi kaupti reikšmingai daugiau Zn, Cu ir Ni.

MT koncentracijos didėjimą žuvų audiniuose indukuoja Zn, Cu, o taip pat ir Cd (Hylland et al., 1992; Knapen et al., 2007; Min et al., 2016). MT pagrindinis vaidmuo organizme – palaikyti būtinųjų metalų (Zn, Cu) homeostazę bei apsaugoti organizmą nuo toksiškų metalų (Pb, Cd) pertekliaus (Vasak 2005; Coyle et al., 2002). Mūsų tyrimo rezultatai atskleidė nevienodą skirtingų žuvų rūšių reakciją į SM. Gyvūninės kilmės maistu mintančios, o tuo pačiu – Cd ir Pb labiau kaupiančios žuvyse pasireiškė reikšmingas MT koncentracijos padidėjimas kepenyse. Tuo tarpu visaėdės kuojos kepenyse, kurios labiau kaupė būtinuosius metalus, nustatyta reikšminga koreliacija tarp MT ir Zn. Tačiau reikšminga MT indukcija *R. rutilus* kepenyse nebuvo sukelta. Tai gali būti siejama su tuo, kad Zn yra būtinas metalas organizmui, o MT indukcijai sukelti reikalingas didesnis Zn kiekis.

MT koncentracija dažniausiai tiriama žuvų kepenyse, inkstuose bei žiaunose, nes šie audiniai dalyvauja metalų patekimo ir kaupimosi procesuose (Van Campenhout et al., 2003; Min et al., 2016). Tačiau šio tyrimo rezultatai parodė, kad MT indukcija kepenyse vyko intensyviau nei inkstuose. Taip pat įrodyta, kad skirtingos žuvų rūšys, skirtingai indukuoja MT sintezę skirtinguose audiniuose (De Boeck et al., 2003). Tai rodo ir šio tyrimo rezultatai: didžiausia MT koncentracija nustatyta *R. rutilus* kepenyse bei *P. fluviatilis* inkstuose (tiek kontrolės, tiek poveikio grupėje).

Atlikta nemažai gamtinių ir eksperimentinių tyrimų, kuriuose bandoma įrodyti MT vaidmenį, vertinant SM apkrovą aplinkoje. Gamtiniuose tyrimuose lyginami galimai užteršti vandens telkiniai su vidutiniškai užterštais ar galimai švariais ir dažnai ieškoma koreliacinio ryšio tarp SM koncentracijos vandenyje ir MT koncentracijos žuvų audiniuose (Mieiro et al., 2011; Knapen et al., 2007). Eksperimentinių tyrimu metu, žuvis dažnai veikiama atskirais metalais prie itin aukštų koncentracijų, todėl nustatomas itin stiprus koreliacinis ryšys tarp SM ir MT koncentracijos audiniuose (Min et al., 2016; Chowdhury et al., 2005). Tačiau taip pat nurodoma, kad yra ir kiti kintamieji, kurie turi įtakos MT koncentracijos svyravimams žuvų audiniuose. MT lygis žuvų audiniuose dažnai priklauso nuo žuvų lytinės brandos, amžiaus, endogeninių ir egzogeninių veiksnių: reprodukcinų steroidų, streso hormonų, sezoninių pokyčių, vandens temperatūros, druskingumo, mitybos, nuo audinio ir metalo tipo, SM apkrovos aplinkoje. Todėl MT informatyvumas aiškinantis metalų kaupimosi mechanizmus žuvų audiniuose yra kvestionuojamas (Olsson et al., 1995; Olsson 1996).

Šio tyrimo rezultatai parodė, kad daugianaris SM mišinys (MIX) (esant realioms, gamtinei aplinkai artimoms koncentracijoms) nesukėlė reikšmingos MT indukcijos skirtingų žuvų rūšių kepenyse ir inkstuose, tačiau apjungus gyvūninės kilmės maistu mintančių žuvų (*S. salar* ir *P. fluviatilis*) grupes, nustatytas reikšmingas MT koncentracijos padidėjimas bandymo žuvų kepenyse, lyginant su kontrole. Tai rodo, kad veikiant daugianariu SM mišiniu, net ir sąlyginai saugiomis laikomos (didžiausios leistinos) koncentracijos jau sukelia apsaugines fiziologines organizmo reakcijas.

IŠVADOS

1. Veikiant žuvis daugianariu metalų mišiniu besisukančio vandens sąlygomis, sunkiųjų metalų (SM) kaupimosi žuvyse dėsningumai atitinka dėsningumus, nustatytus gamtinėmis sąlygomis – SM mažiausiai kaupiasi žuvų raumenyse. Stovinčio vandens sąlygomis, SM daugiau kaupiasi raumenyse, priešingai nei besisukančio vandens ar gamtinėmis sąlygomis. Kadangi stovinčio vandens sąlygomis SM kaupimosi dėsningumai pakinta, tokios sistemos netinka eksperimentiniam gamtoje vykstančių procesų tyrimui.
2. Nustatyta, kad optimalus ekspozicijos daugianariu SM mišiniu laikas, kuriam praėjus daugumos SM koncentracijos *S. salar* audiniuose reikšmingai nebedidėja, yra 14 parų.
3. Eksponuojant skirtingas žuvų rūšis (*S. salar*, *R. rutilus*, *P. fluviatilis*) daugianariuose SM mišiniuose nustatyti šie, bendri dėsningumai: Ni kiekis sumažėjo žiaunose ir inkstuose, veikiant žuvis mišiniais, kuriuose Cu ir Cr didžiausia leistina koncentracija (DLK) buvo sumažinta 10 kartų bei raumenyse – veikiant mišiniais, kuriuose Zn ir Pb DLK buvo sumažinta 10 kartų; Cr kiekis padidėjo žiaunose eksponuojant žuvis mišinyje, kuriame Ni DLK buvo sumažinta 10 kartų.
4. Eksponuojant skirtingas žuvų rūšis daugianariuose SM mišiniuose, kuriuose vieno iš metalų DLK buvo sumažinta 10 kartų, kai kurių kitų metalų audiniuose susikaupė daugiau nei veikiant mišiniu, kuriame visų SM koncentracijos atitiko DLK (vieno SM koncentracijos sumažinimas, padidino kito SM kaupimąsi: *S. salar* – 14 atvejų iš 168, *R. rutilus* – 12 atvejų iš 168 ir *P. fluviatilis* – 18 atvejų iš 168).
5. Nustatyta, kad eksponuojant skirtingas žuvų rūšis daugianariuose SM mišiniuose, kuriuose vieno iš metalų DLK yra sumažinta 10 kartų ($SM^{*0,1}$), kai kurių konkrečių metalų audiniuose susikaupė mažiau nei veikiant $SM^{*0,1}$ mišiniu su sumažinta būtent šio, konkretaus metalo

koncentracija (vieno SM koncentracijos sumažinimas, slopino kito SM kaupimąsi: *S. salar* – 7 atvejai iš 168, *R. rutilus* – 13 atvejų iš 168 ir *P. fluviatilis* – 6 atvejai iš 168).

6. Veikiant daugianariais SM mišiniais, visaėdės *R. rutilus* audiniuose daugiau kaupė Zn, Cu, Ni, o gyvūninės kilmės maistu mintančios *S. salar* ir *P. fluviatilis* – Pb, Cd.
7. Nustatyta, kad daugianaris SM mišinys (MIX) esant DLK sukėlė metalotioneinų (MT) indukciją gyvūninės kilmės maistu mintančių poveikio žuvų (*S. salar* ir *P. fluviatilis*) kepenyse, lyginant su kontrole.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Adhikari S, Ghosh L, Ayyappan S (2006). Effect of calcium hardness on toxicity and accumulation of water-borne lead, cadmium and chromium to *Labeo rohita* (Hamilton). *Asian Journal of Water, Environment and Pollution* 4: 103–106
- Allen-Gill SM, Martynov VG (1995) Heavy metals burdens in nine species of freshwater and anadromous fish from the Pechora River, northern Russia. *Science of the Total Environment* 160–161:653–659
- Allen P (1994) Mercury Accumulation Profiles and Their Modification by Interaction with Cadmium and Lead in the Soft Tissues of Cichlid *Oreochromis aureus* during Chronic Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 684–692
- Allen P (1995) Chronic Accumulation of Cadmium in the Edible Tissues of *Oreochromis aureus* (Steindachner): Modification by Mercury and Lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 8–14
- Alves LC, Wood CM (2006) The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic Toxicology* 78: 217–232
- Annabi A, Messaoudi I, Kerkeni A, Said K (2011) Cadmium accumulation and histological lesion in mosquitofish (*Gambusia affinis*) tissues following acute and chronic exposure. *International Journal of Environmental Research* 5: 745–756
- Arnot JA, Gobas FAPC (2006) A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews* 14(4): 257–297
- Atli G, Canli M (2003) The Relationships between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. *Environmental Pollution* 121: 129–136
- Baldisserotto B, Chowdhury MJ, Wood CM (2005) Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water and their interactions in juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 72: 99–117
- Barnes ME; Brown ML, Rosentrater KA (2012) Juvenile rainbow trout responses to diets containing distillers dried grain with solubles, phytase, and amino acid supplements. *Open Journal of Animal Sciences* 2: 69–77
- Barnham, CPSM, Baxter A (2003) *Condition factor, K, for salmonid fish. Fisheries notes*. State of Victoria, Department of Primary Industries. ISSN 1440-2254
- Bervoets L, Blust R (2003) Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution* 126: 9–19
- Birceanu O, Chowdhury MJ, Gillis PL, McGeer JC, Wood CM, Wilkie MP (2008) Modes of metal toxicity and impaired branchial ionoregulation in rainbow trout exposed to mixtures of Pb and Cd in soft water. *Aquatic Toxicology* 89: 222–231
- Blust R, Kockelbergh E, Baillieul M (1992) Effect of salinity on the uptake of cadmium by the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Marine Ecology Progress Series* 84: 245–254
- Borgmann U, Norwood WP, Dixon DG (2008) Modelling bioaccumulation and toxicity of metal mixtures. *Human and Ecological Risk Assessment* 14: 266–289
- Bowen HJM (1979) *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press, London
- Brix KV, Keithly J, DeForest DK, Laughlin J (2004) Acute and chronic toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2221–2228
- Brix KV, Tellis MS, Crémazy A, Wood CM (2016) Characterization of the effects of binary metal mixtures on short-term uptake of Ag, Cu, and Ni by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 180: 236–246
- Bucking C, Wood CM (2007) Gastrointestinal transport of Ca²⁺ and Mg²⁺ during the digestion of a single meal in the freshwater rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B* 177: 349–360
- Burger J, Gaines KF, Boring CS, Stephens WL, Snodgrass J, Dixon C, McMahon M, Shukla S, Shukla T, Gochfeld M (2002) Metal levels in fish from the Savannah River: potential hazards to fish and other receptors. *Environmental Research* 89(1): 85–97
- Bury NR, Walker PA, Glover CN (2003) Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 206: 11–23
- Campbell PGC, Stokes PM (1985) Acidification and toxicity of metals of aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 2034–2049
- Campbell PGC (1995) Interaction between trace metal and aquatic organism. A critique of the free ion activity model. In A. Tessier, & D. R. Turner (Eds.) *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems* Chichester, UK: Wiley, pp. 45–102

- Campbell PGC, Kraemer LD, Giguere A, Hare L, Hontela A (2008) Subcellular distribution of cadmium and nickel in chronically exposed wild fish: Inferences regarding metal detoxification strategies and implications for setting water quality guidelines for dissolved metals. *Human and Ecological Risk Assessment* 14: 290–316
- Calamari D, Gaggino GF, Pacchetti G (1982) Toxicokinetics of Low Levels of Cd, Cr, Ni, and Their Mixture in Long-term Treatment on *Salmo gairdneri* Rich. *Chemosphere* 11: 59–70
- Cedergreen N (2014) Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* 9(5): e96580
- Chahid A, Hilali M, Benhachimi A, Bouzid T (2014) Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 147: 357–360
- Chovanec A, Hofer R, Schiemer F (2003) Fish as bioindicators. Chapter 18. in: Bioindicators & biomonitoring. Elsevier Sci. Ltd., New York, etc. pp. 639–676
- Chowdhury MJ, Grosell M, McDonald DG, Wood CM (2003) Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated and metal-acclimated trout. *Aquatic Toxicology* 64: 259–275
- Chowdhury MJ, McDonald DG, Wood CM (2004) Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. *Aquatic Toxicology* 69: 149–163
- Chowdhury MJ, Baldisserotto B, Wood CM (2005) Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 381–390
- Chowdhury MJ, Wood CM (2007) Renal function in the freshwater rainbow trout after dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C* 145: 321–332
- Chowdhury MJ, Bucking C, Wood CM (2008) Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environmental Science & Technology* 42: 1359–1364
- Clearwater SJ, Farag AM, Meyer JS (2002) Bioavailability and Toxicity of Dietborne Copper and Zinc to Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132: 269–313
- Connell D, Lam P, Richardson B, Wu R (1999) Introduction to ecotoxicology. London, UK: *Blackwell Science*, 170 pp.
- Clemow YH, Wilkie MP (2015) Effects of Pb plus Cd mixtures on toxicity, and internal electrolyte and osmotic balance in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 161: 176–188
- COM (2012) 252 final. Communication From The Commission To The Council. The combination effects of chemicals Chemical mixtures. European Commission, Brussels
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002). Review. Metallothionein: The multiurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 627–647
- Cousins RJ (1985) Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Reviews* 65: 238–309
- Dang ZC, Berntssen MHG, Lundebye AK, Flik G, Wendelaar Bonga SE, Lock RAC (2001) Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium. *Aquatic Toxicology* 53(2): 91–101
- Daukšas K, Barkauskas J, Daukšas V, Daumantas E, Kabailienė M, Kareiva A, Mačionis Z, Naruškevičius L, Sasnauskė S, Skučas V (2003) *Chemijos terminų aiškinamasis žodynas / – 2-asis patasis. ir papild. leid. – Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas (Kaunas: „Spindulys“). 659 p.*
- De Boeck G, Ngo TTH, Van Campenhout K, Blust R (2003) Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology* 65: 413–424
- Dethloff GM, Schlenk D, Khan S, Bailey HC (1999) The Effects of Copper on Blood and Biochemical Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 415–423
- Dethloff GM, Schmitt CJ (2000) Condition factor and organo-somatic indices. In: Schmitt, C.J. and Dethloff, G.M. (eds). Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, (MO): Information and Technology Report USGS/BRD-2000--0005. pp 13–17
- Dhanakumar S, Solaraj G, Mohanra R (2015) Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 145–151
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. 2000. CELEX-EUR Official Journal of the European Communities L 327: 1–72

- Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water 497 policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 498 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 499 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Communities L 500 348, 24/12/2008 p. 0084-0097
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes
- Driessnack MK, Matthews AL, Raine JC, Niyogi S (2016) Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C* 179: 165–173
- Driessnack MK, Jamwal A, Niyogi S (2017) Effects of chronic waterborne cadmium and zinc interactions on tissue specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 140: 65–75
- Duran S, Tunçsoy M, Yeşilbudak B, Ay Ö, Cicik B, Erdem C (2015) Metal Accumulation In Various Tissues Of *Clarias Gariepinus* Exposed To Copper, Zinc, Cadmium And Lead Singly And In Mixture. *Fresenius Environmental Bulletin* 24 – No 12c
- Eastwood S, Couture P (2002) Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquatic Toxicology* 58: 43–56
- EC (2014) (EU) No 488/2014 of 12 May amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. Official Journal of the European Union 2014, L138/75
- EC (2015) (EU) 2015/1005 of 25 June amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2015, L161/9
- Eisler R (1986) Chromium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85, Laurel, MD
- Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry* 312: 224–227
- Erickson RJ, Benoit DA, Mattson VR, Nelson HP Jr, Leonard EN (1996) The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:181–193
- Eroglu K, Atli G, Canli M (2005) Effects of Metal (Cd, Cu, Zn) Interactions on the Profiles of Metallothionein-like Proteins in the Nile Fish *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75: 390–399
- Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos
- Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), OL L 136, 2007 5 29, p.1
- Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 Dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB BEI 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 (OL 2008 L353, p. 1) su paskutiniais pakeitimais, padarytais 2014 m. gruodžio 5 d. Komisijos reglamentu (ES) Nr. 1297/2014 (OL 2014 L 350, p. 1)
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85: 97–177
- Fischer E, Constant M, van den Berg G (2001) Determination of lead complexation in lake water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition. *Analytica Chimica Acta* 432: 11–20
- Fish Feed Technology* (1980) Lectures Presented at the Fao/undp Training Course in Fish Feed Technology, Held at the College of Fisheries, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A., 9 October-15 December 1978. Rome: United Nations Development Programme, Print.
- Fromm PO, Stokes RM (1962) Assimilation and metabolism of chromium by trout. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 35: 1151–1155
- Gailiūšis B, Jablonskis J, Kovalenkoviėnė M (2001) *Lietuvos upės. Hidrografija ir nuotėkis*. Kaunas: Lietuvos energetikos institutas. 792 p.
- Gendusa TC, Beitinger TL (1992) External biomarkers to assess chromium toxicity in adult *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 237–242
- General and Human Biology*. Essential Study Partner (2001). McGraw-Hill Inc, New York, NY
- Georgieva E, Stoyanova S, Velcheva I, Yan Cheva V (2014) Histopathological alterations in common carp (*Cyprinus carpio* L.) gills caused by thiamethoxam. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57(6): 991–996

- Ghosh L, Adhikari S (2006) Accumulation of heavy metals in freshwater fish – an assessment of toxic interactions with calcium. *American Journal of Food Technology* 1: 139–148
- Ghosh L, Adhikari S, Ayyappan S (2007) Assessment of Toxic Interactions of Heavy Metals and Their Effects on Accumulation in Tissues of Freshwater Fish. *Research Journal of Environmental Toxicology* 1: 37–44
- Giguere A, Campbell PGC, Hare L, Cossu-Leguille C (2005) Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 563–577
- Gill TS, Bianchi CP, Epple A (1992) Trace Metal (Cu and Zn) Adaptation of Organ Systems of the American Eel, *Anguilla rostrata*, to External Concentrations of Cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C: 361–371
- Giulio RT, Di, Hinton DE (2008) *The Toxicology of Fishes*. CRC Press 1096 psl., p. 240
- Green NW, Knutzen J (2003) Organohalogenes and Metals in Marine Fish and Mussels and Some Relationships to Biological Variables at Reference Localities in Norway. *Marine Pollution Bulletin* 46: 362–374
- Grosell M, McGeer JC, Wood CM (2001) Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper-acclimated trout. *American Journal of Physiology* 280: R796–R806
- Grosell M, Wood CM (2002) Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology* 205: 1179–1188
- Grosell M, Nielsen C, Bianchini A (2002) Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* C133: 287–303
- Grosell M, Gerdes R, Brix KV (2006) Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 143: 473–483
- Grosell M (2012) Homeostasis and toxicology of essential metals. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ, editors. *Fish physiology—copper*. Academic Press, pp. 54–135
- Guérin T, Chekri R, Vastel C, Sirot V, Volatier JL, Leblanc JC, Noël L (2011) Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market. *Food Chemistry* 127(3): 934–942
- Handy RD (1996) Dietary exposure to toxic metals in fish. In: *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches* (E. W. Taylor, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 29–60
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 533: 211–26
- Hardy RW, Sullivan CV, Koziol AM (1987) Absorption, body distribution, and excretion of dietary zinc by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiology and Biochemistry* 3: 133–143
- Harris ED (1991) Copper transport: an overview. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 192: 130–140
- Hashim R, Song TH, Muslim NZM, Yen TP (2014) Determination of Heavy Metal Levels in Fishes from the Lower Reach of the Kelantan River, Kelantan, Malaysia. *Tropical Life Sciences Research* 25(2): 21–39
- Heier LS, Lien IB, Strømseng AE, Ljønes M, Rosseland BO, Tollefsen KE, Salbu B (2009) Speciation of lead, copper, zinc and antimony in water draining a shooting range – Time dependent metal accumulation and biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Science of the Total Environment* 407(13): 4047–4055
- Heys KA, Shore RF, Pereira MG, Jones KC, Martin FL (2016) Risk assessment of environmental mixture effects. *RSC Advances* 6: 47844–47857
- Hinton DE, Laurén DJ (1990) Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *American Fish Society Symposium* 8:51–66
- Hylland K, Haux C, Hogstrand C (1992) Hepatic metallothionein and heavy metals in *limanda limanda* from the German Bight. *Marine Ecology Progress Series* 91: 89–96
- Hodson PV, Blunt BR, Spry DJ (1978) Chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Lake Ontario water. *Water Research* 12: 869–878
- Hogstrand C, Verbost PM, Wendelaar Bonga SE, Wood CM (1996b). Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport. *American Journal of Physiology* 270: R1141–R1147
- Hollis L, McGeer JC, McDonald DG, Wood CM (2000) Protective effects of calcium against chronic waterborne cadmium exposure to juvenile rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2725–2734
- Hudson RJM (1998) Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Science of the Total Environment* 219: 95–115

- Idzelis RL, Kesminas V, Svecevičius G, Misius V (2008) Sunkiųjų metalų (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd) kaupimasis ešerio *Perca fluviatilis* L. ir kuojos *Rutilus rutilus* (L.) audiniuose eksperimento sąlygomis. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 16(4): 205–212
- Idzelis RL, Kesminas V, Svecevičius G, Venclovas A (2010). Experimental investigation of heavy metal accumulation in tissues of stone loach *Noemacheilus barbatulus* (L.) and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) exposed to a model mixture (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd). *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 18(2): 111–117
- Irwin RJ, Van Mouwerik M, Stevens L, Seese MD, Basham W (1997) Chromium VI (Hexavalent chromium). Environmental contaminants encyclopaedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado
- ISO 7888:1985 Water quality. Determination of electrical conductivity
- ISO 6332:1988 Water quality. Determination of iron – Spectrometric method using 1.10-phenanthroline
- ISO 5814:1990 Water quality. Determination of Dissolved Oxygen – Electrochemical Probe Method
- ISO 9963-1:1994 Water quality. Determination of alkalinity – Part 1: Determination of total and composite alkalinity
- ISO 14911:1998 Water quality. Determination of dissolved Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} using ion chromatography – Method for water and waste water
- ISO 15586:2003. Water quality. Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace. Geneva, International Organization for Standardization
- ISO 10304-1:2007 Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions - Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate
- ISO 10523:2008 Water quality. Determination of pH
- Jeziarska B, Witeska M (2001) Metal Toxicity to Fish. *Reviews in fish Biology and Fisheries* 11(3): 279–279
- Jeziarska B, Witeska M (2006) The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In: Twardowska, I., et al. (eds) Soil and Water pollution Monitoring, Protection and Remediation. Springer, pp. 3–23
- Jia H, Ren H, Satoh S, Endo H, Hayashi T (2005) Comparison of pre-treatment condition of cadmium in fish sample and diet by microwave digestion method for ICP-AES. *Journal of the Tokyo University Marine Science and Technology* 1: 41–46
- Jia Y, Wang L, Zhipeng Qu, Wang Z, Yang Z (2017) Effects on heavy metal accumulation in freshwater fish: species, tissues, and sizes. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI 10.1007/s11356-017-8606-4
- Kamunde CN, Grosell M, Lott JNA, Wood CM (2001) Copper metabolism and gut morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic sublethal dietary copper exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 293–305
- Kamunde C, Clayton C, Wood CM (2002a) Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *American Journal of Physiology* 283: R69–R78
- Kargin F, Çoğun H (1999) Metal Interaction during Accumulation and Elimination of Zinc and Cadmium in Tissues of the Freshwater Fish *Tilapia nilotica*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63: 511–519
- Karthikeyan S, Palaniappan PLRM, Sabhanayakam S (2007) Influence of PH and Water Hardness upon Nickel Accumulation in Edible Fish *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Environmental Biology* 28: 489–492
- Karadede H, Oymak SA, Ünlü E (2004) Heavy metals in mullet, Liza abu, and catfish, *Silurus triostegus*, from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Environment International* 30(2): 183–188
- Kasprzak KS (1987). Nickel. Adv. Mod. *Environmental Toxicology* 11: 145–183
- Kim JH, Birks E, Heisinger JF (1977) Protective Action of Selenium against Mercury in Northern Creek Chubs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 17(2): 132–136
- Klaverkamp JF, Hodgins DA, Lutz A (1983) Selenite Toxicity and Mercury–Selenium Interactions in Juvenile Fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 12: 405–413
- Klinck JS, Green WW, Mirza RS, Nadella SR, Chowdhury MJ, Wood CM, Pyle GG (2007) Branchial cadmium and copper binding and intestinal cadmium uptake in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated lakes. *Aquatic Toxicology* 84: 198–207
- Knapen D, Reynders H, Bervoets L, Verheyen E, Blust R (2007) Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. *Aquatic Toxicology* 82: 163–172
- Komjarova I, Blust R (2009a) Multimetal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn uptake from water in the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* 43: 7225–7229

- Komjarova I, Blust R (2009b) Effects of Na, Ca, and pH on the Simultaneous Uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the Zebrafish *Danio rerio*: A Stable Isotope Experiment. *Environmental Science and Technology* 43(20): 7958–7963
- Köck G, Hofer R, Wögrath S (1995) Accumulation of trace metals (Pb, Cd, Cu, Zn) in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from oligotrophic Alpine lakes: relation to lake alkalinity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 2367–2376
- Kroglund F, Rosseland BO, Teien HC, Salbu B, Kristensen T, Finstad B (2008) in Water quality limits for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to short term reductions in pH and increased aluminum simulating episodes. *Hydrology and Earth System Sciences* 12: 491–507
- Kwong RW, Niyogi S (2009) The interactions of iron with other divalent metals in the intestinal tract of a freshwater teleost, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology- Part C* 150: 442–449
- Larson A, Haux C, Sjöbeck M (1985) Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9: 250–28
- Liebel S, Tomokake MEM, Oliveira Ribeiro CA (2013) Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 8(2): 9–15
- LR AM įsakymas, dėl nuotekų tvarkymo reglamento patvirtinimo (Žin., 2006, Nr. 59-2103; 2010, Nr. 59-2938, 2011, Nr. 39-1888)
- Luczynska J, Tonska E (2006) The Effect of Fish Size on the Content of Zinc, Iron, Copper, and Manganese in the Muscles of Perch (*Perca fluviatilis* L.) and Pike (*Esox lucius* L.). *Archives of Polish Fisheries* 14: 5–13
- Luoma SN, Rainbow PS (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science & Technology* 39(7): 1921–31
- Madenjian CP, Blanchfield PJ, Hrenchuk LE, Van Walleggem JLA (2014) Mercury Elimination Rates for Adult Northern Pike *Esox lucius*: Evidence for a Sex Effect. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93: 144–148
- Mager EM, Esbaugh AJ, Brix KV, Ryan AC, Grosell M (2010b) Influences of water chemistry on the acute toxicity of lead to *Pimephales promelas* and *Ceriodaphnia dubia*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 153: 82–90
- Manton WI, Cook JD (1984) High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid. *British Journal of Industrial Medicine* 41: 313–319
- Marshall WS, Bryson SE, Wood CM (1992) Calcium transport by isolated skin of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 166: 297–316
- Marshall WS (2002) Na⁽⁺⁾, Cl⁽⁻⁾, Ca⁽²⁺⁾ and Zn⁽²⁺⁾ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 293: 264–283
- Mason AZ, Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, pp 479–608. John Wiley and Sons, Chichester, UK
- McGeer JC, Nadella S, Alsop DH, Hollis L, Taylor LN, McDonald DG, Wood CM (2007) Influence of acclimation and cross-acclimation of metals on acute Cd toxicity and Cd uptake and distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 84: 190–197
- Merciai R, Guasch H, Kumar A, Sabater S, GarcíaBerthou E (2014) Trace Metal Concentration and Fish Size: Variation among Fish Species in a Mediterranean River. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107: 154–161
- Metian M, Warnau M, Chouvelon T, Pedraza F, Rodriguez Y Baena AM, Bustamante P (2013) Trace element bioaccumulation in reef fish from New Caledonia: Influence of trophic groups and risk assessment for consumers. *Marine Environmental Research* 87(88): 26–36
- Mieiro CL, Bervoets L, Joosen S, Blust R, Duarte AC, Pereira ME, Pacheco M (2011) Metallothioneins failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish – Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere* 85: 114–121
- Miller PA, Munkittrick KR, Dixon DG (1992) Relationship between concentrations of copper and zinc in water, sediment, benthic invertebrates, and tissues of white sucker (*Catostomus commersoni*) at metal-contaminated sites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 978–84
- Miller PA, Lanno RP, McMaster ME, Dixon DG (1993) Relative contributions of dietary and waterborne copper to tissue copper burdens and waterborne copper tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 1683–1689
- Min EY, Ahn TY, Ju-Chan Kang (2016) Bioaccumulation, alterations of metallothionein, and antioxidant enzymes in the mullet *Mugil cephalus* exposed to hexavalent chromium. *Fisheries and Aquatic Sciences* 19:19

- Moore JW (1991) Inorganic contaminants of surface water: research and monitoring priorities. Springer – Verlag, New York, Heidelberg, Berlin
- Nadella SR, Grosell M, Wood CM (2007) Mechanisms of dietary Cu uptake in freshwater rainbow trout: evidence for Na-assisted Cu transport and a specific metal carrier in the intestine. *Journal of Comparative Physiology B* 177: 433–446
- Nielsen G, Bjerregaard P (1991) Interaction Between Accumulation of Cadmium Selenium in the Tissues of Turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Toxicology* 20(4): 253–265
- Niyogi S, Wood CM (2003) Effects of chronic waterborne and dietary metal exposures on gill metal-binding: Implications for the Biotic Ligand Model. *Human and Ecological Risk Assessment* 9: 813–846
- Niyogi S, Wood CM (2004) Biotic Ligand Model, a flexible tool for developing site specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science & Technology* 38: 6177–6192
- Niyogi S, Wood CM (2006) Interaction between dietary calcium supplementation and chronic waterborne zinc exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 143: 94–102
- Niyogi S, Kent R, Wood CM (2008) Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a biotic ligand model (BLM) approach. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C* 148: 305–314
- Niyogi S, Nadella SR, Wood CM (2015) Interactive effects of waterborne metals in binary mixtures on short-term gill-metal binding and ion uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 165: 109–119
- Norwood WP, Borgmann U, Dixon DG, Wallace A (2003) Effects of metal mixtures on aquatic biota: A review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment* 9: 795–811
- Nunes B, Campos JC, Gomes R, Braga MR, Ramos AS, Antunes SC, Correia AT (2015) Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: antioxidant mechanisms and histological alterations. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1): 667–678
- Ojeda JL, Icardo JM, Domezain A (2003) Renal corpuscle of the sturgeon kidney: an ultrastructural, chemical dissection and lectin – exogenous estradiol on the formation of ovaries in binding study. *The Anatomical Record* 272: 563–573
- Ojo AA, Wood CM (2007) In vitro analysis of the bioavailability of six metals via the gastro-intestinal tract of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 83:10–23
- Ojo AA, Nadella SR, Wood CM (2009) In vitro examination of interactions between copper and zinc uptake via the gastrointestinal tract of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 244–252
- Olsson PE, Kling P, Erkell L, Kill P (1995) Structural and functional analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein-A gene. *European Journal of Biochemistry* 230: 344–349
- Olsson PE (1996) Metallothionein in fish: induction and use in environmental monitoring, In: Toxicological aquatic pollution: physiological, molecular and cellular approaches (Cambridge, UK: Cambridge University Press)
- Olsson P E, Kling P, Hogstrand C (1998) Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, edited by W. J. Langston and M. Bebianno, London. Chapman and Hall, pp. 321–350
- Palaniappan PL, Karthikeyan S (2009) Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in a binary solution with nickel. *Journal of Environmental Sciences* 21: 229–236
- Pane EF, Richards JG, Wood CM (2003) Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquatic Toxicology* 63: 65–82
- Pane EF, Haque A, Goss GG, Wood CM (2004a) The physiological consequences of exposure to chronic, sublethal waterborne nickel in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): exercise vs resting physiology. *Journal of Experimental Biology* 207: 1249–1261
- Pane EF, Haque A, Wood CM (2004b) Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. *Aquatic Toxicology* 69: 11–24
- Pane EF, Bucking C, Patel M, Wood CM (2005) Renal function in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute and prolonged exposure to waterborne nickel. *Aquatic Toxicology* 72: 119–133.
- Pane EF, Glover CN, Patel M, Wood CM (2006a) Characterization of Ni transport into brush border membrane vesicles (BBMVs) isolated from the kidney of the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 74–84

- Pane EF, McDonald MD, Curry HN, Blanchard J, Wood CM, Grosell M (2006b) Hydromineral balance in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) exposed to waterborne or infused nickel. *Aquatic Toxicology* 80: 70–81
- Pane EF, Patel M, Wood CM (2006c) Chronic, sublethal nickel acclimation alters the diffusive properties of renal brush border membrane vesicles (BBMVs) prepared from the freshwater rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 143: 78–85
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C et al. (2002) The Biotic ligand model: A historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 133: 3–35
- Patel M, Rogers JT, Pane EF, Wood CM (2006) Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 80: 362–371
- Paviršinių vandenų būklė. Aplinkos apsaugos agentūra. [interaktyvus]. Žiūrėta: 2016-05-15. Prieiga per internetą <<http://vanduo.gamta.lt/cms/index?rubricId=9dcd6f683-c66b-4d0e-809b-932cb708d0a0>>
- Pawert M, Müller E, Triebskorn R (1998) Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue Cell* 30:617–626
- Peixoto NC, Roza T, Flores EMM, Pereira ME (2003) Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicology Letters* 146: 17–25
- Pelgrom SMGJ, Lamers LPMJ, Garritsen AM, Pels BM, Lock RAC, Balm PHM, Wendelaar Bonga SE (1994) Interactions between Copper and Cadmium during Single and Combined Exposure in Juvenile Tilapia *Oreochromis mossambicus*: Influence of Feeding Condition on Whole Body Metal Accumulation and the Effect of the Metals on Tissue Water and Ion Content. *Aquatic Toxicology* 30: 117–135
- Pelgrom SMGJ, Lock RAC, Balm PHM, Wendelaar Bonga SE (1995) Effects of combined waterborne Cd and Cu exposures on ionic composition and plasma Cortisol in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111: 227–235
- Pelgrom SMGJ, Lamers LPMJ, Lock RAC, Balm PHM, Bonga SE (1995) Interactions between Copper and Cadmium Modify Metal Organ Distribution in Mature Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Pollution* 90: 415–423
- Perera PACT, Kodithuwakku SP, Sundarabarathy TV, Edirisinghe U (2015) Bioaccumulation of Cadmium in Freshwater Fish: An Environmental Perspective. *Insight Ecology* 4(1): 1–12
- Playle RC, Dixon DG, Burnison K (1993a) Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2667–2677
- Playle RC, Dixon DG, Burnison K (1993b) Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2678–2687
- Playle RC (1998) Modelling metal interactions at fish gills. *The Science of the total Environment* 219: 147–163
- Playle RC (2004) Using multiple metal-gill binding models and the toxic unit concept to help reconcile multiple-metal toxicity results. *Aquatic Toxicology* 67: 359–370.
- Price NM, Morel FMM (1990) Role of extracellular enzymatic reactions in natural waters. In: Stumm, W. (Eds.), *Aquatic chemical kinetics: reaction rates of processes in natural waters. Environmental Science and Technology* New York: Wiley, 236–258
- Pyle G, Couture P (2012) Nickel. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ (eds) *Homeostasis and toxicology of essential metals, fish physiology*, Academic Press, London. 31A: 253–289
- Ploetz DM, Fitts BE, Rice TM (2007) Differential accumulation of heavy metals in muscle and liver of a marine fish, (King Mackerel, *Scomberomorus cavalla* Cuvier) from the Northern Gulf of Mexico, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78(2): 134–137
- Praeivių žuvų būklės monitoringas Lietuvos upėse. Aplinkos apsaugos agentūra. [interaktyvus]. Žiūrėta 2016-11-26. Prieiga per internetą <<http://gamta.lt/cms/index?rubricId=47f04440-d850-4c12-9fd5-f05dd595ef37>>
- Projekto „Sunkiųjų metalų kaupimasis žuvyse ir dugno nuosėdose“ rezultatų apžvalga (2003). Aplinkos apsaugos agentūra
- Ptashynski MD, Klaverkamp JF (2002) Accumulation and distribution of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 58: 249–264
- Qiu AD, Hogstrand C (2005) Functional expression of a low-affinity zinc uptake transporter (FrZIP2) from pufferfish (*Takifugu rubripes*) in MDCK cells. *The Biochemical Journal* 390: 777–786
- Rainbow PS (1997) Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44: 169–175
- Rainbow PS (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120: 497–507

- Rayment GE, Barry GA (2000) Indicator tissues for heavy metal monitoring – additional attributes. *Marine Pollution Bulletin* 41(7–12): 353–358
- Reilly C (2004) The nutritional trace metals. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, UK
- Ribeiro AM, Risso WE, Fernandes MN, Martinez CBR (2014) Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40: 645–657
- Ribeyre F, Amiardtriquet C, Boudou A, Amiard JC (1995) Experimental-study of Interactions between Five Trace Elements – Cu, Ag, Se, Zn, and Hg – Toward Their Bioaccumulation by Fish (*Brachydanio rerio*) from the Direct Route. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32: 1–11
- Riener CK, Kada G, Gruber HJ (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 266–276
- Rogers JT, Richards JG, Wood CM (2003) Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 64: 215–234
- Rogers JT, Wood CM (2004) Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology* 207: 813–825
- Rogers JT, Patel M, Gilmour KM, Wood CM (2005) Mechanisms behind Pb induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289: R463–R472
- Roy SP (2010) Overview of heavy metals and aquatic environment with notes on their recovery. *Ecoscan* 4: 235–240
- Rosseland BO, Rognerud S, Collen P, Grimalt JO, Vives I, Massavuau JC et al. (2007) Brown trout in Lochnagar: pollution and contamination by metals and organic micropollutants. In: Rose N. L. (Ed): Lochnagar: the Natural History of a Mountain Lake. Dordrecht, Springer, pp. 253–285
- Saglam D, Atli G, Canli M (2013) Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92: 79–86
- Sauliūtė G, Svecevičius G (2015) Siesarties ir Vilnios upių ekotoksikologinės būklės įvertinimas pagal atlantinės lašišos (*Salmo salar* L.) jauniklių morfologinius rodiklius. „Mokslas – Lietuvos ateitis/Science – Future of Lithuania“, *Environmental Protection Engineering* 7(4): 424–429
- Sauliūtė G, Svecevičius G (2016) Changes in Morphological Indexes of Young Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Exposed to Heavy Metal (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) Mixture: an Experimental Study. „Mokslas – Lietuvos ateitis/Science – Future of Lithuania“, *Environmental Protection Engineering* 8(4): 411–417
- Sauliūtė G, Svecevičius G (2015) Heavy metal interactions during accumulation via direct route in fish: a review. *Zoology and Ecology* 25(1): 77–86
- Sauliūtė G, Svecevičius G (2017) Heavy Metals (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) in Water and Body Tissues of Young Atlantic Salmon *Salmo salar* in Two Rivers of Different Pollution Level: A Comparison with Fish Condition Parameters. *Fresenius Environmental Bulletin* 26(1a): 666–673
- Schjolden J, Sorensen J, Nilsson GE, Poleo ABS (2007) The toxicity of copper to crucian carp (*Carassius carassius*) in soft water. *Science of the Total Environment* 384: 239–251
- Schmitt CJ, Whyte JJ, Brumbaugh W, Tillitt DE (2005) Biochemical effects of lead, zinc, and cadmium from mining on fish in the Tri-states District of Northeastern Oklahoma, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1483–1495
- Scorecard (2011) Water quality indicators. Ambient water quality: four toxic pollutants. [interaktyvus]. Žiūrėta 2016-07-07. Prieiga per internetą <http://scorecard.goodguide.com/env-releases/def/iwi_wqi.html>
- Shahsavarani A, McNeill B, Galvez F, Wood CM, Goss GG, Hwang PP, Perry SF (2006) Characterization of a branchial epithelial calcium channel (ECac) in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 209: 1928–1943
- Simkiss K, Taylor MG (1989) Metal fluxes across membranes of aquatic organisms. *Reviews in Aquatic Science* 1: 173–188
- Spehar RL, Leonard EN, Defoe DL (1978) Chronic Effects of Cadmium and Zinc Mixtures on Flagfish (*Jordanella floridae*). *Transactions of the American Fisheries Society* 107(2): 354–360
- Stankevičiūtė M, Sauliūtė G, Svecevičius G, Kazlauskienė N, Baršienė J (2017) Genotoxicity and cytotoxicity response to environmentally relevant complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) accumulated in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Part I: importance of exposure time and tissue dependence. *Ecotoxicology* 26(8): 1051–1064 (doi 10.1007/s10646-017-1833-0)
- Streit B (1998) Bioaccumulation of contaminants in fish, in Braunbeck, T., Hinton, D. and Streit, B. (Eds). *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag Base 353–387
- Svecevičius G (2006) Acute Toxicity of Hexavalent Chromium to European Freshwater Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77:741–747

- Svecevičius G (2007b) Avoidance response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to hexavalent chromium solutions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 596–600
- Svecevičius G, Idzelis RL, Mockutė E (2014) Accumulation of heavy metals in different body tissues of Gibel carp *Carassius gibelio* separately exposed to a model mixture (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd) and nickel. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 22(4): 292–300
- Svecevičius G, Sauliūtė G, Idzelis RL, Grigelevičiūtė J (2014) Accumulation of Heavy Metals in Different Body Tissues of Atlantic Salmon *Salmo salar* L., Exposed to a Model Mixture (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd) and Singly to Nickel, Chromium, and Lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92: 440–445
- Tao S, Liang T, Cao J, Dawson RW, Liu C (1999). Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 190–195
- Taylor LN, McGeer JC, Wood CM, McDonald DG (2000). Physiological effects of chronic copper exposure to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in hard and soft water: evaluation of chronic indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2298–2308
- Teien HC, Kroglund F, Salbu B, Rosseland BO (2006) Gill reactivity of aluminium-species following liming. *Science of the Total Environment* 358(1–3): 206–220
- Thomann RV, Shkreli F, Harrison S (1997) A pharmacokinetic model of cadmium in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 2268–2274
- Thompson J, Bannigan J (2008) Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology* 25: 304–315
- Tunçsoy M, Erdem C (2014) Accumulation of Copper, Zinc and Cadmium in Liver, Gill and Muscle Tissues of *Oreochromis niloticus* Exposed to These Metals Separately and in Mixture. *Fresenius Environmental Bulletin* 23(5): 1143–1149
- US EPA (1985) Ambient water quality criteria for chromium – 1984. EPA-440/5-84-029. Office of Water Regulations and Standards. Washington, DC
- US EPA (2009) National recommended water quality criteria. Office of Water, Office of Science and Technology (4304T)
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 178–189
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57–149
- Van der Putte I, Brinkhorst MA, Koeman JH (1981a) Effect of pH on the acute toxicity of hexavalent chromium to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology* 1: 129–142
- Van der Putte I, Lubbers J, Kolar K (1981b) Effect of pH on uptake, tissue distribution and retention of hexavalent chromium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology* 1: 3–18
- Van Hoof F, Nauwelaers JP (1984) Distribution of Nickel in the Roach (*Rutilus rutilus* L.) after Exposure to Lethal and Sublethal Concentrations. *Chemosphere* 13: 1053–1058
- Van Campenhout K, Bervoets L, Blust R (2003) Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): relationship with metal concentrations in tissues and environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1548–1555
- Varanasi U, Markey D (1978) Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C* 60: 187–191
- Vasak M (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 13–7
- Verboost PM, Van Rooij J, Flik G, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE (1989) The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *Journal of Experimental Biology* 145: 185–197
- Vinodhini R, Narayanan M (2008) Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science and Technology* 5(2): 179–182
- Virbickas J (1986) Lietuvos žuvis. Vilnius „Mokslas”, p. 152
- Voets J, Talloen W, de Tender T, van Dongen S, Covaci A, Blust R, Bervoets L (2006) Micro contaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology* 79: 213–225
- Wallace WG, Lee BG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249: 183–97

- Wang WX, Rainbow PS (2006) Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry* 3: 395–399
- Watanabe T, Kiron V, Satoh S (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185–207
- Wepener V, Vuren JHJV, Preez HHD (2001) Uptake kinetics and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA*, 27: 99–108
- Westernhagen HV, Dethlefsen V, Rosenthal H (1979) Combined Effects of Cadmium, Copper and Lead on Developing Herring Eggs and Larvae. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 32(3): 257–278
- Wicklund A, Runn P (1988) Calcium effects on cadmium uptake, redistribution and elimination in minnows, *Phoxinus phoxinus*, acclimated to different calcium concentrations. *Aquatic Toxicology* 13: 109–122
- Wicklund Glynn A (1991) Cadmium and zinc kinetics in fish: studies on water-borne ¹⁰⁹Cd and ⁶⁵Zn turnover and intracellular distribution in the minnow, *Phoxinus phoxinus* *Pharmacol. Toxicology* 68: 485–491
- Wicklund Glynn A, Norrgren L, Mussener A (1994) Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquatic Toxicology* 30: 13–26
- Wicklund Glynn A (2001) The influence of zinc on apical uptake of cadmium in the gills and cadmium influx to the circulatory system in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C* 128: 165–172
- Wilson JM, Laurent PM (2002) Fish Gill Morphology: Inside out. *Journal of Experimental Zoology* 293:192–213
- Winter AR, Playle RC, Dixon DG b, Borgmann Uwe, Wilkie MP (2012) Interactions of Pb and Cd mixtures in the presence or absence of natural organic matter with the fish gill. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 83: 16–24
- Wood CM (1992) Flux measurements as indices of H⁺ and metal effects on freshwater fish. *Aquatic Toxicology* 22: 239–264
- Wood CM, Adams WJ, Ankley GT (1997) Environmental toxicology of metals. In: Bergman, H.L., Doward-King, E.J. (Eds), *Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection: Priorities for Research and Implementation*. SETAC Press, Pensacola, Florida, USA
- Woodward D F, Farag AM, Bergman HL, Delonay AJ, Little EE, Smith CE, Barrows FT (1995) Metals contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana – effects on age-0 brown trout and rainbow trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 1994–2004
- Worms I, Simona DF, Hasslera CS, Wilkinson KJ (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88: 1721–1731
- Xue HB, Jansen S, Prasch A, Sigg L (2001) Nickel speciation and complexation kinetics in freshwater by ligand exchange and DPCSV. *Environmental Science & Technology* 35: 539–546
- Yancheva VS (2010) Trace metals in different Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) organs from the River Storelva catchment area. Master thesis 60 credits. Department of Plant and Environmental Sciences. Norwegian University of Life Sciences.
- Yancheva V, Stoyanova S, Velcheva I, Petrova S, Georgieva E (2014) Metal Bioaccumulation in Common Carp and Rudd from the Topolnitsa Reservoir, Bulgaria. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 65: 57–66
- Yeşilbudak B, Erdem C (2014). Cadmium Accumulation in Gill, Liver, Kidney and Muscle Tissues of Common Carp, *Cyprinus carpio*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92(5): 546–50
- Yousafzai AM, Chivers DP, Khan AR, Ahmad I, Siraj M (2010) Comparison of heavy metals burden in two freshwater fishes *Wallago attu* and *Labeo dyocheilus* with regard to their feeding habits in natural ecosystem. *Pakistan journal of zoology* 42(5): 537–544
- Zhao JL, Liu YS, Liu WR, Jiang YUX, Su HC, Zhang QQ, Mager XW, Yang YY, Chen J, Liu SS, Pan CG, Huang GY, Ying GG (2015) Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environmental Pollution* 198: 15–24
- Žuvis ir jos maistinės savybės (2014) Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas. [interaktyvus]. Žiūrėta 2016-02-17. Prieiga per internetą <<http://sena.nmrvri.lt/laboratoriniai/580>>

PUPBLIKCIJŲ SĄRAŠAS

1. Svecevičius G, **Sauliutė G**, Idzelis LR, Grigelevičiūtė J (2014) Accumulation of heavy metals in different body tissues of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., exposed to a model mixture (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd) and singly to nickel, chromium, and lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92(4): 440–445 (Q3, IF = 1,412).
2. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2014) Sunkiųjų metalų biokoncentracijos potencialo atlantinės lašišos (*Salmo salar* L.) kūno audiniuose įvertinimas veikiant modeliniu mišiniu ir atskirais metalais. *17-osios Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos „Mokslas – Lietuvos ateitis“ straipsnių rinkinys* Vilnius, Technika. 228 p. 142–148.
3. Svecevičius G, Kazlauskienė N, Kesminas V, Staponkus R, Taujanskis E, **Sauliutė G** (2014) Heavy Metal Accumulation in Fishes of Different Ecological Groups from Kairiai Landfill Regional Aquatic Ecosystem. *9th International Conference on Environmental Engineering* (doi: 10.3846/enviro.2014.060).
4. Svecevičius G, Kazlauskienė N, Kesminas V, Staponkus R, **Sauliutė G**, Taujanskis E, Slučkaitė A, Makaras T (2014) Complex Study into Toxic Effects of Heavy Metals Discharged from Closed Landfill on Neighbouring Aquatic Ecosystem. *Journal of International Environmental Application and Science* 9(5): 619–628.
5. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2015) Heavy metal interactions during accumulation via direct route in fish: a review. *Zoology and Ecology* 25(1): 77–86.
6. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2015) Siesarties ir Vilnios upių ekotoksikologinės būklės įvertinimas pagal atlantinės lašišos (*Salmo salar* L.) jauniklių morfologinius rodiklius. „*Mokslas – Lietuvos ateitis/Science – Future of Lithuania*“, *Environmental Protection Engineering* 7(4): 424–429.
7. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2016) Assessment of Landfill Pollution Load on Hydroecosystem by Use of Heavy Metal Bioaccumulation Data in Fish. *World Academy of Science, International Journal of Environmental, Chemical, Ecological, Geological and Geophysical Engineering* 10(1): 44–51.
8. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2016) Changes in Morphological Indexes of Young Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Exposed to Heavy Metal (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb,

- Cd) Mixture: an Experimental Study. „*Mokslas – Lietuvos ateitis/Science – Future of Lithuania*“, *Environmental Protection Engineering* 8(4): 411–417.
9. **Sauliutė G**, **Svecevičius G** (2017) Heavy Metals (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) in Water and Body Tissues of Young Atlantic Salmon *Salmo salar* in Two Rivers of Different Pollution Level: A Comparison with Fish Condition Parameters. *Fresenius Environmental Bulletin* 26(1a): 666–673 (Q4, IF = 0,425).
 10. Stankevičiūtė M, **Sauliutė G**, **Svecevičius G**, Kazlauskienė N, Baršienė J (2017) Genotoxicity and cytotoxicity response to environmentally relevant complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) accumulated in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Part I: importance of exposure time and tissue dependence, *Ecotoxicology* 26(8): 1051–1064 (Q2, IF = 1,951).
 11. **Sauliutė G**, Stankevičiūtė M, **Svecevičius G**, Baršienė J, Valskienė R (2017). Assessment of heavy metals bioconcentration factor (BCF) and genotoxicity response induced by metal mixture in *Salmo salar* tissues. *10th International Conference on Environmental Engineering* (doi: <https://doi.org/10.3846/enviro.2017.043>).
 12. Stankevičiūtė M, **Sauliutė G**, Makaras T, Markuckas A, Virbickas T, Baršienė J. Genotoxicity and cytotoxicity response to environmentally relevant complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) accumulated in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Part II: importance of 10-fold reduction of mixture components and stress induction in fish, *Ecotoxicology* (**pateiktas** Ms. Ref. No.: ECTX-D-18-00059) (Q2).

Konferencijų tezės

1. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2016) Heavy Metal Accumulation Patterns In The Body Tissues Of Ecologically Different Fish Species. Abstracts of the The Coins'16 – *11th international conference of natural and life sciences*, 29 February – 3 March 2016, Vilnius, Lithuania, 49–50. (Online <http://thecoins.eu/sites/default/files/dokai/knygute2016.pdf>).
2. Kazlauskienė N, Cibulskaitė Ž, Svecevičius G, **Sauliutė G**, Makaras T, Rotomskis R, Kulvietis V, Stankevičius M, Markuckas A, Stankevičiūtė M, Baršienė J (2016) Nanoparticle And Heavy Metal Toxicity Mechanisms In Fish During Ontogenesis:

An Interdisciplinary Project. Abstracts of the The Coins'16 – *11th international conference of natural and life sciences*, 29 February – 3 March 2016, Vilnius, Lithuania, 64–65. (Online <http://thecoins.eu/sites/default/files/dokai/knygute2016.pdf>).

KONFERENCIJOS

1. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2014) Sunkiųjų metalų biokoncentracijos potencialo atlantinės lašišos (*Salmo salar* L.) kūno audiniuose įvertinimas veikiant modeliniu mišiniu ir atskirais metalais. 17-osios *Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos* „Mokslas – Lietuvos ateitis“ antropogeninės taršos poveikis aplinkai sekcijoje. 2014 m. balandžio 11 d. Vilnius. Žodinis pranešimas.
2. Svecevičius G, Kazlauskienė N, Kesminas V, Staponkus R, Taujanskis E, **Sauliutė S** (2014) Heavy Metal Accumulation in Fishes of Different Ecological Groups from Kairiai Landfill Regional Aquatic Ecosystem. *9th International Conference on Environmental Engineering*, MAY 22-23, 2014 Vilnius, LITHUANIA, stendinis pranešimas.
3. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2015) Siesarties ir Vilnios upių ekotoksikoginės būklės įvertinimas pagal atlantinės lašišos (*Salmo salar* L.) jauniklių morfologinius rodiklius. 18-osios *Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos* „Mokslas – Lietuvos ateitis“ antropogeninės taršos poveikis aplinkai sekcijoje. 2015 m. balandžio 9 d. Vilnius. Žodinis pranešimas.
4. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2016) Assessment of Landfill Pollution Load on Hydroecosystem by Use of Heavy Metal Bioaccumulation Data in Fish. *ICEEB 2016: 18th International Conference on Ecology and Environmental Biology*. January, 18-19, 2016, London, United Kingdom. Žodinis pranešimas.
5. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2016) Heavy Metal Accumulation Patterns In The Body Tissues Of Ecologically Different Fish Species. *The Coins'16 – 11th international conference of natural and life sciences*, 29 February – 3 March 2016, Vilnius, Lithuania. Stendinis pranešimas.
6. Kazlauskienė N, Cibulskaitė Ž, Svecevičius G, **Sauliutė G**, Makaras T, Rotomskis R, Kulvietis V, Stankevičius M, Markuckas A, Stankevičiūtė M, Baršienė J (2016) Nanoparticle And Heavy Metal Toxicity Mechanisms In Fish During Ontogenesis: An Interdisciplinary Project. *The Coins'16 – 11th international conference of*

natural and life sciences, 29 February – 3 March 2016, Vilnius, Lithuania.
Stendinis pranešimas.

7. **Sauliutė G**, Svecevičius G (2016) Atlantinių lašišų (*Salmo salar* L.) jauniklių morfologinių rodiklių pokyčiai veikiant sunkiųjų metalų (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) mišiniu: eksperimentinis tyrimas. *19-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Mokslas – Lietuvos ateitis“*, antropogeninės taršos poveikis aplinkai sekcija. 2016 m. balandžio 7 d. Vilnius. Žodinis pranešimas.
8. **Sauliutė G**, Stankevičiūtė M, Svecevičius G, Baršienė J, Valskienė R (2017) Assessment of heavy metals bioconcentration factor (BCF) and genotoxicity response induced by metal mixture in *Salmo salar* tissues. *10th International Conference on Environmental Engineering*, 27–28 April 2017, Vilnius, Lithuania. Žodinis pranešimas.
9. **Sauliutė G** (2017) Sunkiųjų metalų kaupimosi žuvų kūno audiniuose dėsniumai, veikiant daugianariais metalų mišiniais. *Jaunųjų mokslininkų konferencija BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos*. 2017 m. gruodžio 7 d. Vilnius. Žodinis pranešimas.

FINANSAVIMAS

Skirtingos šio tyrimo dalys buvo finansuotos Lietuvos mokslo tarybos projektų Nr. MIP-038/2012 ir Nr. MIP-108/2015 lėšomis.

PADĖKOS

Pirmiausia nuoširdžiai dėkoju amžiną atilsį savo darbo vadovui dr. Gintarui Svecevičiui už kantrybę, moralinį palaikymą, supratingumą, idėjas ir patarimus bei pagalbą rengiant daktaro disertaciją. Taip pat esu be galo dėkinga dabartiniam darbo vadovui dr. Tomui Virbickui, kuris per paskutiniuosius doktorantūros studijų metus sugebėjo sparčiai įsigilinti į tiriamojo darbo tematiką ir nuoširdžiai prisidėti prie šios disertacijos atsiradimo.

Taip pat esu dėkinga darbo recenzentams dr. Kęstučiui Arbačiauskui ir dr. Danguolei Montvydienei už išsamias pastabas pradinei disertacijos versijai.

Už galimybę dalyvauti ekspedicijose bei gauti tyrimams būtiną medžiagą esu dėkinga dr. Vytautui Kesminui, dr. Egidijui Leliūnai bei dr. Audriui Steponėniui. Už metalotioneinų koncentracijos nustatymą žuvų audiniuose nuoširdžiai dėkoju Vilniaus universiteto biochemijos ir molekulinės biologijos katedros docentui Arvydui Markuckui. Dėkoju habil. dr. Janinai Baršienei ir doktorantei Mildai Stankevičiūtei už bendradarbiavimą rengiant mokslines publikacijas bei visokeriopą pagalbą eksperimentinių tyrimų metu. Dr. Nijolei Kazlauskienei esu labai dėkinga už galimybę dalyvauti Lietuvos mokslo tarybos finansuojamame mokslininkų grupių projekte bei už naudingus patarimus rengiant disertaciją. Taip pat norėčiau nuoširdžiai padėkoti dr. Vestai Skrodenytei-Arbačiauskienei už darbo pastabas ir lietuvių kalbos taisymą. Už entuziastingą pagalbą eksperimentinių tyrimų metu nuoširdžiai dėkoju doktorantams – Živilei Cibulskaitėi ir Tomui Makarui.

Galiausiai noriu padėkoti savo šeimos nariams ir draugams už supratingumą, kantrybę ir palaikymą kiekviename žingsnyje rašant daktaro disertaciją. Visiems Jums sakau nuoširdų AČIŪ!