

Analiza teških metala i mineralnog sastava jestivih gljiva ICP-MS tehnikom

Jagatić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department of Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:758830>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivs 3.0 Unported](#)/[Imenovanje-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

ANALIZA TEŠKIH METALA I MINERALNOG
SASTAVA JESTIVIH GLJIVA ICP-MS TEHNIKOM

LUCIJA JAGATIĆ

Split, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

ANALIZA TEŠKIH METALA I MINERALNOG
SASTAVA JESTIVIH GLJIVA ICP-MS TEHNIKOM

Mentor: *Dr. sc. Dario Lasić*

Komentor: *Livia Slišković, mag. biol. et oecol., mag. forens.*

LUCIJA JAGATIĆ

0058198012

Split, rujan, 2024.

Rad je izrađen na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo “Dr. Andrija Štampar” u Zagrebu, na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane NZJZ “Dr. Andrija Štampar”. pod nadzorom dr. sc. Daria Lasića, u vremenskom razdoblju od 05.01.2024. do 31.1.2024.

Datum predaje rada: 11. rujan 2024.

Datum prihvatanja rada: 13. rujan 2024.

Datum obrane rada: 19. rujan 2024.

Ispitno povjerenstvo:

- 1. Doc.dr.sc. Nenad Vuletić**
- 2. Doc.dr.sc. Snježana Štambuk**
- 3. Dr.sc. Dario Lasić**

ZAHVALA:

Zahvaljujem se svom mentoru dr. sc. Dariu Lasiću za provođenje analiza i stručno vođenje u laboratoriju na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane NZJZ “Dr. Andrija Štampar”.

Također, želim izraziti svoju zahvalnost komentorici Liviji Slišković, mag. biol. et oecol., mag. forens. na dostupnosti i podršci prilikom pisanja rada.

Veliku zahvalnost dugujem dragim volonterima iz različitih dijelova Hrvatske koji su bili voljni pomoći skupiti uzorke s različitih lokacija i dostaviti ih u Zagreb.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i kolegama na poslu na neizmjernoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog procesa rada.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Teški metali i njihova prisutnost u okolišu	1
1.1.1. Klasifikacija i podjela minerala.....	1
1.1.2. Definicija teških metala.....	1
1.1.3. Izvori onečišćenja teškim metalima	2
1.2. Toksičan učinak teških metala na okoliš.....	2
1.2.1. Esencijalni metalni ioni	3
1.2.2. Neesencijalni metalni ioni i njihova toksičnost.....	6
1.2.3. Toksičan utjecaj teških metala na ljudsko zdravlje	8
1.3. Carstvo gljiva	9
1.3.1. Gljive kao hiperakumulatori teških metala.....	10
1.3.2. Uloga gljiva u forenzici	11
1.4. Samonikle jestive gljive analizirane u istraživanju	12
1.4.1. Vrganj - <i>Boletus edulis</i>	12
1.4.2. Crna truba - <i>Craterellus cornucopioides</i>	13
1.4.3. Sunčanica - <i>Macrolepiota procera</i>	14
1.5. Toksikološke metode u analizi teških metala.....	15
1.5.1. Mikrovalna razgradnja.....	15
1.5.2. Principi mikrovalne razgradnje	16
1.5.3. Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS).....	17
1.5.4. Princip rada ICP-MS	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Ustroj studije i uzorci	21
3.2. Metode analize	23
3.2.1. Priprema uzorka mokrim spaljivanjem uz mikrovalnu digestiju.....	24
3.2.2. Mjerenje koncentracije minerala i teških metala metodom ICP-MS	26
3.2.2.2. Prikaz rezultata	28
3.2.3. Statističke metode.....	28
4. REZULTATI.....	29
5. RASPRAVA	34

6. ZAKLJUČAK	38
7. LITERATURA	40
8. SAŽETAK	50
9. SUMMARY	52
10. ŽIVOTOPIS	54
Izjava o akademskoj čestitosti	55

POPIS KRATICA:

ICP - Induktivno spregnuta plazma

ICP-MS - Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu

LC-MS - Tekućinska kromatografija - spektrometrija mase

GC-MS - Plinska kromatografija - spektrometrija mase

JEFCA - eng. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - međunarodni znanstveni stručni odbor kojim zajednički upravljaju Organizacija Ujedinjenih naroda za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO).

EDI - eng. "Estimated daily intake" prosječan dnevni unos

ADI - eng. "Acceptable daily intake" prihvatljivi dnevni unos

PU - prehrambena referentna vrijednost (preporučeni dnevni unos)

PTWI - privremeni podnošljivi tjedni unos, za kontaminante koji se mogu akumulirati u tijelu

1. UVOD

1.1. Teški metali i njihova prisutnost u okolišu

1.1.1. Klasifikacija i podjela minerala

Sve stijene litosfere, kao i sitne čestice svemirske prašine koje svakodnevno padaju na naše tlo, sastoje se od prirodnih tvari poznatih kao minerali. Riječ mineral dolazi od latinskih riječi "*minera*" i "*mineralis*", koje označavaju rudnik, odnosno *tvar iz rudnika*. Minerali u prirodi su čvrste, homogene tvari koje imaju kristalnu strukturu i određeni kemijski sastav, a nastali su geološkim procesima (1). Geolozi pod pojmom mineral podrazumijevaju svaki prirodni materijal koji se vadi iz zemlje, uključujući ugljen i naftu, dok nutricionisti minerale definiraju kao elemente (i spojeve) bitne za prehranu, poput kalcija (Ca), magnezija (Mg), željeza (Fe), fosfora (P) i drugih (2).

Mineralni elementi mogu se podijeliti u dvije skupine - esencijalne hranjive sastojke i toksične nefunkcionalne elemente. Esencijalni minerali, obuhvaćaju makroelemente poput kalija (K), kalcija (Ca), magnezija (Mg), fosfora (P), natrija (Na), klora (Cl) i sumpora (S) te mikroelemente kao što su željezo (Fe), cink (Zn), bakar (Cu), bor (B), mangan (Mn), nikal (Ni), fluor (F), silicij (Si), kobalt (Co), vanadij (V) i molibden (Mo). Ti minerali su važni za metaboličke procese, a nedostatak ili odsutnost istih može poremetiti funkciju stanica ili organa (3).

Neki mikroelementi su potrebni u malim količinama, dok njihov pretjerani višak u tlu (posebno bakra, nikla i cinka) može biti štetan za većinu biljnih vrsta. S druge strane, elementi poput kadmija (Cd), žive (Hg), olova (Pb), aluminijska (Al), kroma (Cr), arsena (As) su toksični čak i pri niskim koncentracijama. Oni nisu esencijalni za metabolizam te se smatra da su općenito toksični za različite organizme, kako eukariotske tako i prokariotske (4).

1.1.2. Definicija teških metala

Metali su prirodne komponente koje postoje u ekosustavu. To su tvari visoke električne vodljivosti koje dobrovoljno gube svoje elektrone i stvaraju katione (5). Među 35 prirodnih metala, 23 imaju visoku specifičnu gustoću iznad $5,0 \text{ g/cm}^3$ s atomskom težinom većom od

40,04 i općenito se nazivaju teškim metalima. Tim metalima pripadaju: antimon, telur, bizmut, kositar, arsen, cerij, galij, kadmij, krom, kobalt, talij, zlato, bakar, željezo, olovo, živa, mangan, nikal, platina, srebro, uran, vanadij i cink (6). Ova kategorija metala nazvana teškim metalima, nije poznata samo po svojoj visokoj gustoći, nego što je najvažnije, po svojim štetnim učincima na ekosustav i žive organizme (5). Organometalni spojevi definiraju se kao spojevi koji sadrže barem jednu kovalentnu vezu između atoma metala i ugljika. Oni su važni kao onečišćivači okoliša (7).

1.1.3. Izvori onečišćenja teškim metalima

Teški metali mogu potjecati iz različitih izvora onečišćenja, uključujući industrijske emisije, rudarstvo, poljoprivredu, deponije otpada, promet i druge antropogene aktivnosti. Ovi metali mogu se osloboditi u okoliš u obliku prašine, dima, otpadnih voda ili tla kontaminiranog teškim metalima. Također je važno spomenuti da se teški metali mogu akumulirati u tlu i vodi te se prenose kroz prehrambeni lanac, što može dovesti do kontaminacije hrane i vode.

1.2. Toksičan učinak teških metala na okoliš

Toksičnost teških metala ovisi o njihovom oksidacijskom stanju. Na primjer, Cr(VI) se smatra najtoksičnijim oblikom kroma jer je vrlo reaktivan i lako stvara topljive anorganske spojeve poput kromata (CrO_4^{2-}) i dikromata ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), spojeva koji su izuzetno kancerogeni za sve žive organizme. S druge strane, Cr(III) je manje reaktivan, manje toksičan i uglavnom je vezan za organsku tvar u tlu i vodenim okolišima (8). Također, sposobnost teških metala da perzistiraju u tlu u obliku koji je dostupan korijenima, utječe na njihovu adsorpciju, desorpciju i vezanje u tlu. Ti procesi ovise o pH vrijednosti tla, njegovom sastavu i strukturi (10).

U kiselim tlama teški metali se ioniziraju, što povećava njihovu pokretljivost i olakšava njihovu adsorpciju od strane biljaka. Toksičnost metala također snažno ovisi o su-asistenciji drugih metala u tlu, što može imati sinergijske ili antagonističke učinke ovisno o relativnim koncentracijama i drugim svojstvima tla (7). Na primjer, grah je zaštićen od toksičnosti kadmija pomoću kalcija, koji ograničava akumulaciju kadmija. Konačno, toksičnost teških metala ovisi o biljnoj vrsti. Neke biljke su otporne na metale ili su hiperakumulatori te imaju

mehanizme obrane koji im pomažu izbjeći oštećenja uzrokovana nakupljanjem teških metala. Hiperakumulatori su biljke koje mogu akumulirati visoke koncentracije određenih teških metala, poput kadmija, arsena i drugih metala u tragovima. Trajanje i intenzitet izloženosti tim metalima te drugi okolišni uvjeti, također utječu na osjetljivost biljaka na teške metale (10).

Teški metali mogu izazvati štetne učinke na mnoge načine iako su glavni mehanizmi toksičnosti često rezultat jakih koordinacijskih sposobnosti. Toksični učinci uključuju blokiranje funkcionalnih skupina biološki važnih molekula poput enzima i transportnih sustava za esencijalne hranjive tvari i ione, zamjenu i/ili supstituciju esencijalnih metalnih iona iz biomolekula i funkcionalnih staničnih jedinica, konformacijske promjene, denaturaciju i inaktivaciju enzima, te oštećenje integriteta stanice i organelskih membrana. Organometalni spojevi su općenito toksičniji prema gljivama od odgovarajućih anorganskih metalnih vrsta, a toksičnost organometalnih spojeva varira ovisno o broju i identitetu organskih skupina (7).

1.2.1. Esencijalni metalni ioni

Od 11 minerala i teških metala ispitanih u ovom istraživanju, esencijalni za normalno biološko funkcioniranje smatraju se: nikal (Ni), bakar (Cu), željezo (Fe), cink (Zn) i selenij (Se), dok ostali: olovo (Pb), kadmij (Cd), živa (Hg), arsen (As), krom (Cr) i aluminij (Al) nemaju pozitivnu ulogu za ljudski organizam ali neka istraživanja zaključuju kako njihova prisutnost i njihovi omjeri mogu ukazivati na karakterizaciju pojedinih botaničkih vrsta i/ili geografskog podrijetla. Toksikolog Philippus Theophrastus Aureolus Bonapartus von Hohenheim, prvi je uočio da toksičnost ne ovisi samo o toksičnim svojstvima tvari nego i o upotrebnoj dozi, tako da i neki od ovih esencijalnih metalnih iona u većoj količini mogu imati i negativne posljedice na organizme.

Nikal (Ni) je prepoznat kao esencijalan element za nekoliko važnih bioloških procesa poput zdravog rasta biljaka, životinja i mikroba u tlu/vodi. Identificiran je kao jedan od najvažnijih mikronutrijenata za rast i razvoj biljaka, tako da se njegov nedostatak ne može nadomjestiti nijednim drugim nutrijentom. Nikal igra dobro utvrđenu ulogu u biološkim sustavima. Kod ljudi, nedostatak nikla dovodi do smanjenog rasta u intrauterinom razvoju i također je praćen smanjenom apsorpcijom željeza, što zapravo vodi do anemije. Ureaza, hidrogenaza, s-metil

koenzim-M (CoM) reduktaza, acetil CoA sintetaza, CO dehidrogenaza, Ni-superoksid dismutaza, glioksalaza I i cis–trans izomeraza su svi esencijalni enzimi koji sadrže nikal. Za razliku od teških metala, postoje i neki potencijalni 'lagani metalni' toksikanti, koji postaju ozbiljna prijetnja za okoliš i ekosustave kada su izloženi povišenim razinama. Nikal je jedan od takvih metala. Utvrđeno je da nikal utječe na fotosintetsku funkciju viših biljaka, može degradirati plodnost tla i uzrokovati kronične bolesti kod ljudi. Zbog ogromnog rasta industrije nikla i potrošnje proizvoda koji sadrže nikal, zagađenje okoliša postalo je neizbježno zbog nikla i raznih njegovih nusproizvoda kroz sve faze proizvodnje, korištenja i odlaganja. Među radnicima u industriji rudarenja, taljenja i rafiniranja nikla dijagnosticirane su teške alergije kože, kardiovaskularne bolesti, problemi s bubrezima, plućna fibroza, rak pluća i nosa (11).

Bakar (Cu) je esencijalni nutrijent koji djeluje kao strukturna komponenta u regulatornim bjelančevinama, kao redoks komponenta u transportu elektrona u kloroplastima i mitohondrijima te kao koenzim u enzimima poput bakar-cink superoksid dismutaze (Cu-SOD), citokrom oksidaze, plastocijanina i laktaze, sudjelujući stoga u raznim metaboličkim procesima kao što su signalizacija hormona, metabolizam stanične stijenke i odgovor na stres (12). Bakar je ključan za mnoge važne biološke procese, na primjer kao kofaktor za razne enzime, uključujući fotosintezu, prijenos elektrona unutar bioloških molekula, metabolizam željeza, uklanjanje slobodnih radikala i razne neurološke funkcije (13).

Željezo (Fe) je bitan hranjivi sastojak za biljke, s ključnom ulogom u procesima kao što su fotosintetski prijenos elektrona, tolerancija na oksidativni stres, mitohondrijska respiracija, fiksacija dušika, sinteza hormona i održavanje organela. U tlu se nalazi kao Fe^{3+} i Fe^{2+} , no samo je Fe^{2+} topljiv i pogodan za apsorpciju kod biljaka. Geokemija željeza pod utjecajem je karakteristika tla poput pH vrijednosti, sadržaja organske tvari i razine kisika. Zanimljiva karakteristika toksičnosti željeza je što je uvelike ovisna o tipu tla; često je povezana s nedostatkom fosfora i cinka, zasićenjem vodom i anoksičnim uvjetima. Na primjer, višak cinka u biljci *Arabidopsis thaliana* rezultira smanjenom akumulacijom željeza u izdancima i općenito indukcijom sekundarnog nedostatka željeza (14). Oko 4,8 g željeza može se naći u ljudskom tijelu, što ga čini najzastupljenijim metalnim ionom u tijelu. Oko 80% ukupnog sadržaja željeza nalazi se u cirkulirajućim crvenim krvnim stanicama (hemoglobin) i u mišićima (mioglobin). Preostalih 20% raspoređeno je između skladišnih proteina feritina i

hemosiderina, nekoliko stotina miligrama sudjeluje u enzimskim procesima, a oko 3–4 mg cirkulira u plazmi vezano za transferin (15).

Cink (Zn) je esencijalni element i sudjeluje u mnogim procesima biljnog života, kao što su aktivacija enzima, metabolizam bjelančevina i ugljikohidrata, lipida i nukleinskih kiselina. Cink je kofaktor u mnogim biljnim enzimima s važnim ulogama u primarnom metabolizmu (npr. alkohol dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza, karbonska anhidraza, enzimi uključeni u prijenos elektrona i antioksidativni enzimi), te je također sastavni dio nekoliko transkripcijskih faktora (npr. transkripcijskih faktora s "*cinkovim prstima*"). Cink je obično obilno prisutan u mineralnom sastavu tla te se nalazi u obliku sulfida, sulfata, oksida, karbonata, fosfata i silikata (10). Koncentracija cinka u tlu također je povećana ljudskim aktivnostima kao što su rudarstvo, metalurgija, korištenje vapnenca, sagorijevanje fosilnih goriva i upotreba fosfatnih gnojiva. Pod fiziološkim uvjetima, relativno stabilno oksidacijsko stanje cinka (Zn^{2+}) prevladava u tlu, iako to ovisi o vrsti tla, udjelu gline i minerala, udjelu vlage, brzini vremenskog razlaganja, udjelu organske tvari i mikrobnom stanovništvu. Najvažniji parametar je pH tla. Cink se lakše veže na zamjenske kationske stranice pri visokim vrijednostima pH, dok je više topljiv u kiselim tlima s niskim razinama topljive organske tvari, a te uvjete pogoduje toksičnost cinka (9).

Kod ljudi je uključen u brojne biološke funkcije i smatra se višenamjenskim elementom u tragovima zbog svoje sposobnosti da se veže na više od 300 enzima i više od 2000 transkripcijskih faktora. Njegova je uloga u biokemijskim putevima i staničnim funkcijama, kao što su odgovor na oksidativni stres, homeostaza, imunološki odgovori, replikacija DNA, popravak oštećenja DNA, progresija staničnog ciklusa, apoptoza i starenje. Cink je potreban za sintezu proteina i kolagena, čime doprinosi zacjeljivanju rana i zdravoj koži (16).

Selenij (Se) ima relativno nisku gustoću (4.82 g cm^{-3}) te je prema periodnom sustavu elemenata nemetal koji dijeli mnoga biološka svojstva s drugim mineralima (npr. postoji u tlu u različitim oblicima te može izazvati simptome toksičnosti ovisno o dostupnosti i koncentraciji) (5). Pri niskim koncentracijama, selenij se ponaša kao antioksidans, sudjeluje u protuupalnim procesima te u proizvodnji hormona štitnjače. Nedostatak selenija, koji je češći, smatra se velikim zdravstvenim problemom za milijardu ljudi širom svijeta. Još više njih konzumira manje selenija nego što je potrebno za optimalnu zaštitu od raka, kardiovaskularnih bolesti i teških virusnih infekcija. U ljudskom metabolizmu identificirano je više od dvadeset strukturnih selenoproteina i katalitičkih selenoenzima. Iako je selenij

esencijalni element u tragovima potreban za sve žive organizme, potencijalno je toksičan za prirodne ekosustave zbog svojih bioakumulativnih karakteristika. Gotovo 40% emisija selenija u atmosferu i vodene okoliše potječe iz raznih industrijskih aktivnosti, poput rudarskih operacija. U posljednjim godinama, napredak u kontroli kvalitete vode i praćenju zagađenja pokazao je da je selenij zagađivač od potencijalne ekološke važnosti (17)

1.2.2. Neesencijalni metalni ioni i njihova toksičnost

Aluminij (Al), arsen (As), krom (Cr), kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg) ne pripadaju skupini esencijalnih metalnih iona te su visoko toksični za organizme.

Aluminij (Al) je treći po redu zastupljen element u zemljinoj kori, odmah nakon kisika i silicija, ali nema biološku funkciju u ljudskom organizmu. U prirodi se nikada ne pojavljuje kao elementarna tvar (6). S obzirom na sveprisutnu ljudsku izloženost aluminiju od fetusa pa sve do starosti, čini njegovu prisutnost u mozgu neizbježnom. Unatoč nedostatku biološke esencijalnosti, on sudjeluje u biokemiji mozga, tako što zamjenjuje esencijalne metale u kritičnim biokemijskim procesima. Naravno utjecaj će ovisiti o kroničnoj izloženosti i nakupljanju. Njegova neurotoksičnost u neurodegenerativnom smislu do sada je ispitana na životinjskom modelu, te je potrebno provesti još ispitivanja kod ljudi (18).

Arsen (As) je izrazito toksičan teški metaloid. Pokazuje karakteristike i metala i nemetala, pa se stoga naziva metaloidom. Međutim, s toksikološkog stajališta naziva se teškim metalom. Rasprostranjen je u okolišu i prepoznat je kao značajna prijetnja ljudskom zdravlju. Glavni put izloženosti je putem pitke vode zbog prirodne kontaminacije podzemnih voda anorganskim arsenom iz zemljine kore, što ugrožava zdravlje više od 140 milijuna ljudi širom svijeta (19). Kronična izloženost arsenu povezana je s razvojem širokog spektra ljudskih karcinoma (npr. pluća, koža, jetra, mjehur i bubrezi), kao i drugih nemalignih poremećaja (npr. respiratorne bolesti, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, neurotoksičnost i bubrežne bolesti) (20, 21). Izloženost arsenu inducira stvaranje unutarstaničnih reaktivnih vrsta kisika, koje posreduju u višestrukim promjenama u ponašanju stanica mijenjajući signalne puteve i epigenetske modifikacije ili uzrokuju izravno oksidativno oštećenje molekula (19).

Krom (Cr) je uobičajen u okolišu i zbog svoje složene elektronske kemije postoji u mnogim oksidacijskim stanjima na kojima ovisi njegova toksičnost. Krom i njegovi derivati postali su

javnozdravstveni problem zbog onečišćenja okoliša i učinaka na ljudsko zdravlje. Oksidacijsko stanje kroma utječe na zdravstvene rizike. Cr(VI) je izrazito toksičan i ima veću topljivost u vodi od Cr(III). Izloženost Cr(VI) oslobađa slobodne radikale i reaktivne vrste kisika (ROS) dok oksidira ostatke gvanina kroz unutarnju redukciju kromata, što dovodi do genotoksičnih učinaka putem reaktivnih oblika kroma koji mogu oštetiti DNA baze (22). Jedno od istraživačkih područja koje dobiva sve više na važnosti su epigenetske promjene izazvane Cr (VI), koje dovode do somatskih promjena u ekspresiji gena neovisnih o promjenama u DNA sekvencama. Jedan od najbolje poznatih i najviše istraženih epigenetskih mehanizama je metilacija DNA, koja je rezultat utjecaja okolišnih faktora, dobi, spola i profesionalne izloženosti kemikalijama (23).

Kadmij (Cd) je toksičan neesencijalni prijelazni metal koji predstavlja zdravstveni rizik za ljude i životinje. Prirodno je prisutan u okolišu kao zagađivač koji potječe iz poljoprivrednih i industrijskih izvora. Jedan je od jačih fitotoksičnih teških metala jer se vrlo lako otapa u vodi i brzo se apsorbira u biljkama. Izloženost kadmiju prvenstveno se događa kroz unos kontaminirane hrane i vode te, u značajnoj mjeri, kroz udisanje i pušenje cigareta. Kadmij se akumulira u biljkama i životinjama s dugim poluživotom od oko 25-30 godina. Kada kadmij uđe u tijelo, prenosi se u krvotok putem eritrocita i albumina te se zatim akumulira u bubrezima, jetri i crijevima. Izlučivanje kadmija iz tijela je sporo i odvija se putem bubrega, urina, sline i mlijeka tijekom dojenja (24). Nedavne studije pokazuju da kadmij inducira razne epigenetske promjene u stanicama sisavaca, i *in vivo* i *in vitro*, uzrokujući patogene rizike i razvoj različitih vrsta raka uključujući rak dojke, pluća, prostate, nazofarinksa, gušterače i bubrega. Također je dokazano da kadmij iz okoliša može biti faktor rizika za osteoporozu. (25,26).

Olovo (Pb) je jedan od teških metala koji se često pronalazi kako u kopnenim tako i u vodenim okolišima, prije svega kao posljedica ljudskih aktivnosti poput rudarenja, metalurgije, upotreba goriva i eksploziva te odlaganja otpadnih komunalnih muljeva obogaćenih olovom. Uz kadmij (Cd), olovo također predstavlja jednu od najozbiljnijih opasnosti za ljudsko zdravlje, jer se lako apsorbira od strane biljaka i stoga može lako ući u prehrambeni lanac. Olovo kod biljaka nespecifično blokira apsorpciju drugih kationa kao što su kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), mangan (Mn), cink (Zn), bakar (Cu) i željezo (Fe) (27). Olovo ometa više biokemijskih procesa, uključujući inhibiciju kalcija i reakciju s proteinima. Kada uđe u tijelo, olovo zauzima mjesto kalcija i zatim se povezuje s biološkim

molekulama, ometajući njihovu normalnu funkciju. Olovo smanjuje aktivnost različitih enzima, uzrokujući promjene u njihovoj strukturi, i inhibira njihovu aktivnost natječući se za vezna mjesta s potrebnim kationima. Oksidativni stres uzrokovan olovom glavni je mehanizam odgovoran za njegovu toksičnost, uzrokujući promjene u sastavu masnih kiselina u membranama (što utječe na procese poput egzocitoze i endocitoze, te procese prijenosa signala). Olovo također može uzrokovati promjene u ekspresiji gena (28). Toksičnost olovom je važna za ekosustav i ima razorne učinke na ljudsko zdravlje. Gotovo da nema funkcije u ljudskom tijelu na koju ne utječe toksičnost olova. Dok je u SAD-u i Kanadi uporaba olova donekle kontrolirana, u zemljama u razvoju postoji veći problem. Zbog svojih jedinstvenih fizikalnih i kemijskih svojstava olovo ima široku primjenu, pa je postao uobičajeni zagađivač okoliša u svijetu kao posljedica industrijalizacije. Trovanje olovom remeti funkcije probavnog, živčanog, dišnog i reproduktivnog sustava. Osim toga remeti normalnu funkciju enzima, te ometa normalan proces transkripcije DNK (29).

Živa (Hg) je klasificirana kao teški metal i poznata je kao jedan od najotrovnijih metala. Prisutna je u okolišu i postoji u tri oblika: elementarna, anorganska i organska živa. Svi oblici žive izazivaju toksične učinke kod sisavaca. Svaki oblik žive ima jedinstveni toksikološki profil i razlikuje se u mehanizmima transporta i raspodjele u tijelu te u metaboličkoj razgradnji. Iako se živa ispušta iz prirodnih i antropogenih izvora, studije ukazuju na to da je onečišćenje okoliša živom rezultat ljudskih aktivnosti. Na primjer, razine žive u površinskim vodama su se utrostručile od industrijske revolucije. Koncentracije žive u arktičkim morskim životinjama danas su oko 10–12 puta više nego u predindustrijskim vremenima (30). Izloženost živom može biti akutna ili kronična. I akutna i kronična izloženost mogu rezultirati trovanjem kod ljudi i uzrokovati kašalj, dispneju, groznicu, drhtanje, malaksalost, aksijalnu senzorno-motornu polineuropatiju, gingivitis, halucinacije i eritizam, gubitak memorije, nesanicu i neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove bolesti ili amiotrofične lateralne skleroze (31).

1.2.3. Toksičan utjecaj teških metala na ljudsko zdravlje

Kada teške metale unesemo hranom ili vodom u tijelo, oni se u kontaktu s kiselim medijem želuca oksidiraju do svojih različitih oksidativnih stanja i tada se lako vežu na pojedine biološke molekule kao što su bjelancevine i enzimi kako bi formirali stabilne i jake veze.

Najčešće su to tio skupine (*SH*- skupina cisteina i *SCH₃*- skupina metionina). Bjelančevine vezane za teške metale mogu biti supstrat za određene enzime. U takvim situacijama, bjelančevina vezana za teške metale uklapa se u enzim pri čemu nastaje kompleks enzim-supstrat i stoga ne može primiti niti jedan drugi supstrat dok se ne oslobodi. Kao takav, produkt supstrat se ne formira jer je enzim blokiran, stoga teški metal ostaje ugrađen u tkivo što dovodi do disfunkcija, abnormalnosti i oštećenja u tijelu. Također mogu istiskivati neke druge esencijalne ione ili inhibirati sintezu bjelančevina (5).

Mnogi štetni zdravstveni učinci teških metala traju dugo, a izloženost teškim metalima nastavlja se i raste u mnogim dijelovima svijeta. Teški metali su značajni zagađivači okoliša, a njihova toksičnost postaje sve važniji problem zbog ekoloških, evolucijskih, nutritivnih i zdravstvenih razloga. Najčešće prisutni teški metali u otpadnim vodama uključuju arsen, kadmij, krom, bakar, olovo, nikal i cink, koji svi predstavljaju rizike za ljudsko zdravlje i okoliš (32).

Trovanje teškim metalima može imati više štetnih učinaka na organizam. Oni mogu oštetiti i promijeniti funkcioniranje organa poput mozga, bubrega, pluća, jetre ili krvi. Toksičnost teškim metalima može biti akutna ili kronična. Dugotrajna izloženost tijela teškim metalima može progresivno dovesti do mišićnih, fizičkih i neuroloških degenerativnih procesa koji su slični bolestima kao što su Parkinsonova bolest, multipla skleroza, mišićna distrofija i Alzheimerova bolest. Također, kronična dugotrajna izloženost nekim teškim metalima (npr, arsen, kadmij, krom, nikal) može povećati rizik za razvoj raka (21).

1.3. Carstvo gljiva

Gljive pripadaju carstvu *Fungi* unutar eukariotske domene. Od procijenjenih 1,5–5 milijuna vrsta gljiva, opisano je samo oko 120 000. One povezuju razliku između mikro- i makroorganizama, od jednostaničnih kvasaca do složenih makrogljiva koje proizvode strukture koje po veličini pariraju biljkama i životinjama. Budući da ne posjeduju kloroplaste, gljive se svrstavaju među heterotrofne organizme (33).

Mnoge gljive su saprofiti, što znači da se hrane organskim tvarima uginulih bića. Razmnožavaju se na nespolan i spolan način putem sporulacije i pupanja. Jedno od obilježja gljiva je njihova sposobnost apsorpcije organskih i anorganskih otopljenih tvari iz izrazito razrijeđenih otopina u okolišu, akumulirajući ih 1000 puta ili više u odnosu na njihov koncentracijski gradijent (34). Mogu se pronaći u stratosferi i na dnu Mrtvog mora, od

antarktičkih glečera do užarenih pustinja, od crijeva muha do dubokih oceanskih sedimenata i svugdje između (35).

1.3.1. Gljive kao hiperakumulatori teških metala

Organizmi koji akumuliraju teške metale u velikim količinama nazivaju se hiperakumulatori teških metala. Ovi organizmi mogu podnositi i nakupljati izuzetno visoke koncentracije metala u svojim nadzemnim dijelovima. Gljive su također poznate kao hiperakumulatori teških metala, imaju sposobnost akumulacije visoke koncentracije teških metala u svojim staničnim strukturama bez ozbiljnih štetnih posljedica na svoj rast i reprodukciju te stoga preživljavaju i do 5300 godina (36). Koncentracije teških metala u gljivama su znatno veće nego u poljoprivrednim kulturama, povrću i voću. To sugerira da gljive posjeduju vrlo učinkovit mehanizam koji im omogućava lako preuzimanje nekih teških metala iz ekosustava. Mnoge divlje jestive vrste gljiva poznate su po akumulaciji visokih koncentracija teških metala poput olova (Pb), kadmija (Cd), željeza (Fe), bakra (Cu), mangana (Mn), cinka (Zn), kroma (Cr), nikla (Ni), aluminijska (Al) i žive (Hg) (37).

Razvoj otpornosti na metale kod mikroorganizama nastao je zbog njihove kontinuirane izloženosti toksičnim tvarima od početka života, prije najmanje 3,5 milijarde godina. Kao odgovor na prisutnost neželjenog metala, gljive su razvile kako intra- tako i ekstra-stanične mehanizme za otpor na toksične učinke metala. Jedna od strategija je uključivanje ekstracelularnog sustava poput kelacije metala i staničnog vezivanja, pri čemu je ulazak metalnog iona u unutrašnjost stanice spriječen (38).

Gljive akumuliraju teške metale pomoću dva mehanizma: *pasivnog unosa (biosorpcija)* i *aktivnog unosa*. U prvom mehanizmu, teški se metali mogu uhvatiti u staničnoj strukturi i potom biosorbirati na vezna mjesta. Osim toga, ovaj proces je energetski neovisan. Aktivni unos koristi biološki metabolički ciklus za prijenos teških metala u stanicu kroz staničnu membranu (39). Vrsta mehanizma ovisi o toksičnosti akumuliranog metala i uvjetima okoline. Većina apsorbiranih metalnih iona nejednako je raspoređena unutar plodnog tijela gljive. Prema istraživanju Mleczecka i sur., niskomolekularne organske kiseline sadržane u gljivama vjerojatno igraju značajnu ulogu u unosu elemenata u tragovima (40).

Gljive igraju vitalnu ulogu u svim ekosustavima i sposobne su regulirati protok hranjivih tvari i energije kroz svoje micelijske mreže, zbog čega se smatraju prirodnim i pravim

inženjerima ekosustava. Kroz svoje micelijalne strukture, gljive mogu ekstrahirati teške metale iz tla, čime se smanjuje koncentracija metala u okolišu i pomaže u pročišćavanju zemljišta i vode. Stoga, istraživanje i identifikacija vrsta gljiva koje su najučinkovitije u hiperakumulaciji određenih teških metala ima važnu ulogu u potencijalnoj primjeni ovih organizama u fitoremedijaciji. Kombinacija hiperakumulativnih biljaka i gljiva u fitoremedijaciji može biti posebno učinkovita jer se ove dvije vrste mogu međusobno nadopunjavati u pročišćavanju onečišćenog okoliša od teških metala (41).

1.3.2. Uloga gljiva u forenzici

Analiza samoniklih jestivih gljiva s različitih lokacija ima značajan potencijal u forenzičkoj analizi i može pomoći u različitim aspektima kriminalističkih istraga. Neke od uloga gljiva u takvim analizama mogu biti:

- **Geolokacijska identifikacija** - različite vrste gljiva rastu u specifičnim ekosustavima i geografskim područjima. Poznavajući ekološke uvjete i staništa određenih vrsta gljiva, forenzičari mogu utvrditi moguće podrijetlo pronađenih gljiva na osobi ili predmetu. Na primjer, ako se na obući osumnjičenika pronađe specifična vrsta gljive koja raste samo u određenom području, to može biti ključan dokaz za njegovu prisutnost na tom mjestu.
- **Dokaz trovanja** - analizom gljiva prikupljenih s određenih lokacija, forenzičari mogu utvrditi prisutnost i koncentraciju toksičnih spojeva u tom području što može biti korisno u slučajevima trovanja, gdje se toksikološkom analizom može utvrditi izvor toksina i povezati ga s određenom lokacijom ili incidentom.
- **DNA identifikacija** - gljive sadrže genetski materijal koji se može koristiti za identifikaciju vrsta i njihovih specifičnih staništa. Ako se DNA gljiva nađe na osobi ili predmetu, forenzičari mogu povezati te dokaze s određenim mjestima. Na primjer, prisutnost gljiva na odjeći osumnjičenika može potvrditi njegovu prisutnost na određenoj lokaciji, što može biti ključno u rekonstrukciji događaja.
- **Ekološki indikatori** - gljive reflektiraju specifične ekološke uvjete svog staništa, poput kvalitete tla i zraka. Analizom gljiva prikupljenih s određenih lokacija, forenzičari mogu dobiti informacije o ekološkom stanju tog područja što je korisno u

istragama zločina kao što su ilegalno odlaganje otpada ili zagađenje okoliša, gdje se može utvrditi utjecaj takvih aktivnosti na lokalnu floru i faunu.

- **Analiza tragova i mikročestica** - gljive mogu ostaviti mikroskopske spore na predmetima i osobama. Korištenjem naprednih tehnika kao što su plinska kromatografija - spektrometrija mase (GC-MS) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), forenzičari mogu identificirati ove mikročestice i povezati ih s određenim lokacijama ili događajima. Analizom spora pronađenih na odjeći ili obući, moguće je rekonstruirati kretanje osumnjičenika i njihovu prisutnost na određenim mjestima.

1.4. Samonikle jestive gljive analizirane u istraživanju

1.4.1. Vrganj - *Boletus edulis*

Osim što je poznata po svojoj kulinarskoj izvrsnosti, ova gljiva također izaziva zanimanje u različitim znanstvenim područjima zbog svojih jedinstvenih karakteristika i ekološkog značaja. Prirodno stanište gljive *Boletus edulis* (slika 1) proteže se duž Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Uspijeva u vlažnim, hranjivim tlima ispod šumskih krošnji hrasta, kestena ili bora. Morfološki, *Boletus edulis* ima karakterističan izgled koji se očituje u čvrstom stručku, širokom klobuku i mreži pora umjesto listića ispod klobuka. Klobuk varira u boji od svijetlo smeđe do tamnog kestena, dok meso ostaje kremasto bijelo, što ga razlikuje od potencijalno toksičnih vrsta koje mu nalikuju. Njegova ljekovita svojstva su antioksidativna, protuupalna i imunomodulacijska, obećavajuća u liječenju raznih bolesti, uključujući rak, kardiovaskularne bolesti i upalna stanja (42). Vrganj također akumulira velike količine nekih teških metala, posebice žive (43). Iako je koncentracija teških metala u klobucima *B. edulis* relativno visoka, obično nije opasna za ljudsko zdravlje jer se gljive konzumiraju povremeno. Preporučeni udio šumskih gljiva u ljudskoj prehrani je otprilike 300-500 g tjedno. Međutim, kada se plodna tijela skupljaju iz izrazito zagađenih područja ili se gljive redovito jedu, to može predstavljati toksikološku opasnost (40).



Slika 1. Pravi vrganj - *Boletus edulis* (izvor: autor)

1.4.2. Crna truba - *Craterellus cornucopioides*

Stanište crne trube (Slika 2) pruža nam uvid u njezinu povezanost s raznolikim ekosustavima. Često se nalazi u listopadnim i mješovitim šumama, preferirajući vlažna, humusom bogata tla. Njezina prisutnost obogaćuje biološku raznolikost šumskih podzemlja, pružajući dom mnogim mikroorganizmima i drugim živim bićima. Morfologija crne trube je lako prepoznatljiva. Ima široki trubasti oblik, koji se sužava prema dnu. Boja joj varira od crne do tamno sive, često s blago valovitim rubovima. Može sadržavati antioksidativne spojeve koji pružaju zaštitu od oksidativnog stresa i upala. Osim toga, tradicionalna medicina često je koristila crnu trubu u pripravcima za poticanje imunološkog sustava i poboljšanje općeg zdravlja. U okviru ekološke perspektive, crna truba igra važnu ulogu u ciklusu hranjivih tvari u šumskim ekosustavima. Kao saprofit, razgrađuje mrtvu organsku tvar i vraća hranjive tvari u tlo, pridonoseći plodnosti i održivosti šumskih područja (44).



Slika 2. Crna truba *Craterellus cornucopioides* (izvor: autor)

1.4.3. Sunčanica - *Macrolepiota procera*

Macrolepiota procera, poznatija kao sunčanica (Slika 3), obično obitava na otvorenim područjima kao što su livade, pašnjaci, rubovi šuma, parkovi i ceste. Preferira sunčana ili polusjenovita mjesta s dovoljno vlage, često se pojavljujući u proljeće i jesen. Može biti prilično velika, s visokim stručkom i širokim klobukom. Također ima sposobnost akumuliranja teških metala iz tla, poput drugih gljiva. Ova gljiva, koja se često nalazi na livadama i šumskim rubovima, može upiti teške metale poput kadmija (Cd), olova (Pb) i žive (Hg) iz tla (45).



Slika 3. Sunčanica *Macrolepiota procera* (izvor: autor)

1.5. Toksikološke metode u analizi teških metala

Analiza teških metala u hrani ili biljkama uključuje različite toksikološke metode koje omogućuju precizno određivanje prisutnosti i koncentracije tih metala. Neke od tehnika koje se koriste u toksikološkim laboratorijima su:

- **Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS)** je tehnika koja koristi apsorpciju svjetlosti pri specifičnim valnim duljinama kako bi odredila koncentraciju teških metala. AAS se može koristiti za pojedinačne elemente i pruža visoku osjetljivost.
- **Induktivno spregnuta plazma masenom spektrometrijom (ICP-MS)** je tehnika koja omogućuje analizu više elemenata istovremeno, pružajući visoku osjetljivost i niske granice detekcije. Ova tehnika koristi induktivno spregnutu plazmu za stvaranje iona, a zatim ih analizira pomoću masenog spektrometra.
- **Induktivno spregnuta plazma optičkom emisijskom spektroskopijom (ICP-OES)** je tehnika koja je slična ICP-MS-u, ali umjesto masenog spektrometra, koristi optički spektrometar za mjerenje svjetlosnih emisija elemenata.
- **Elektrokemijske metode** su tehnike koje uključuju elektrokemijsku analizu (ECA) i elektrokemijsku detekciju (ECD), a koje omogućuju određivanje koncentracije teških metala putem elektrokemijskih reakcija.
- **Fluorescentna spektrometrija X-zraka (XRF)** je tehnika koja se može koristiti za analizu teških metala u uzorcima pomoću emisije karakterističnih X-zračenja nakon izlaganja uzorka X-zračenju.
- **Kromatografija s masenim detektorom (LC-MS ili GC-MS)** su metode analize specifično usmjerene na teške metale, ali se također mogu koristiti za analizu različitih spojeva, uključujući organske spojeve teških metala.

1.5.1. Mikrovalna razgradnja

Mikrovalna razgradnja je tehnika koja se koristi za razgradnju kompleksnih organskih tvari u uzorcima prije daljnje analize. Ova tehnika koristi mikrovalne valove kako bi brzo i učinkovito zagrijala uzorak i ubrzala kemijske reakcije potrebne za razgradnju organskih spojeva. Uzorak se stavlja u poseban mikrovalni digester, zajedno s određenim reagensima

koji potiču kemijske reakcije razgradnje. Zagrijavanjem mikrovalovima na visokim temperaturama, dolazi do brze i kontrolirane razgradnje organskih spojeva u jednostavnije produkte. Princip mikrovalne razgradnje temelji se na sposobnosti mikrovalnih valova da prodiru u materijal i generiraju toplinu unutar uzorka. Ova tehnika često se koristi u kemijskim laboratorijima za ubranu pripremu uzoraka, posebice za razgradnju organskih tvari prije analize (46).

1.5.2. Principi mikrovalne razgradnje

Osnovni principi mikrovalne razgradnje uključuju:

- Apsorpciju mikrovalova: Materijali koji sadrže vodu, soli ili druge polarno-ionske spojeve mogu apsorbirati mikrovalove. Mikrovalovi su elektromagnetski valovi visoke frekvencije koji mogu uzrokovati rotaciju i vibraciju molekula u tvari koja apsorbira te valove.
- Generiranje topline: Kada mikrovalovi prodiru u uzorak, oni uzrokuju brze promjene u orijentaciji i brzini vibracije molekula, što rezultira generiranjem topline. Ova toplina omogućuje brzo zagrijavanje uzorka.
- Kontrolirano zagrijavanje: Postupak mikrovalne digestije kontrolira se parametrima kao što su snaga mikrovalova, vrijeme izlaganja i vrsta reagensa dodanih uzorku. Ovi parametri se prilagođavaju kako bi se postigla brza i kontrolirana razgradnja ciljanih spojeva (47).

Izbor reagensa ovisi o vrsti uzorka, ciljevima analize i vrsti informacija koje želimo dobiti. Često se koriste jake kiseline poput dušične (HNO_3) i sumporne kiseline (H_2SO_4). Kiseline imaju nekoliko funkcija u mikrovalnoj razgradnji, uključujući povećanje toplinske stabilnosti uzorka, poboljšanje razgradnje organskih tvari, i konverziju određenih elemenata u njihove oksidirane oblike pogodne za analizu. Neki postupci mikrovalne razgradnje zahtijevaju dodatak oksidansa poput vodikovog peroksida (H_2O_2). Oksidansi mogu povećati brzinu i potpunost razgradnje uzorka, posebice za organske tvari. Za određene vrste uzoraka može biti koristan dodatak alkalnih tvari poput natrijevog hidroksida (NaOH). Alkalne tvari mogu pomoći u razgradnji određenih materijala i prilagodbi pH vrijednosti uzorka. Ponekad se koriste organska otapala poput metanola ili etanola kako bi se poboljšala razgradnja

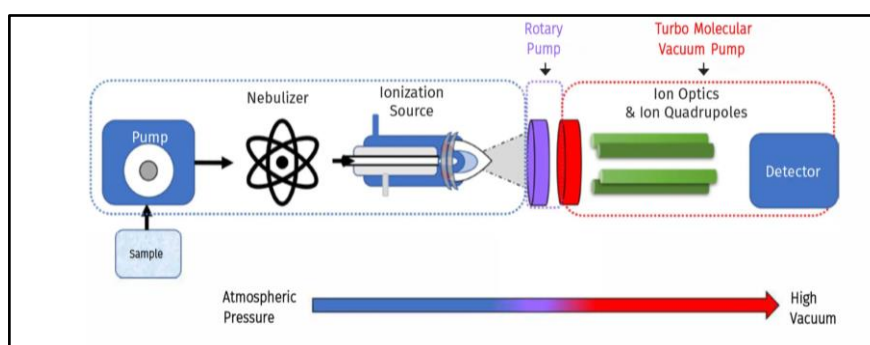
organskih tvari i omogućila bolja interakcija mikrovalova s uzorkom. Važno je pravilno prilagoditi sastav reagensa kako bi se postigla učinkovita razgradnja uzorka i priprema za željenu analizu, kao što je spektrometrija mase s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) ili slične tehnike (46).

1.5.3. Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS)

Spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je analitička tehnika koja se koristi za određivanje koncentracija različitih elemenata u uzorcima. Ova metoda kombinira induktivno spregnutu plazmu (ICP) i maseni spektrometar te omogućava visoku osjetljivost i preciznost. To je tehnika analize elemenata, za razliku od LC/MS i GC/MS koje analiziraju različite molekule i spojeve iz uzorka. Induktivno spregnuta plazma (ICP) je visokoenergetska plazma koja se stvara primjenom visokofrekventnog elektromagnetskog polja na inertni plin (obično argon). Ova plazma doseže vrlo visoke temperature (oko 10 000 K) i sastoji se od ioniziranih čestica i elektrona. Induktivno zagrijavanje uzrokuje ionizaciju uzorka i pretvaranje elemenata u njihove pozitivno nabijene ione. ICP-MS može mjeriti praktički svaki prirodni element te mnoge "radiogeničke" izotope poput tehnecija, neptunija, plutonija i americija. Jedini elementi koje ICP-MS ne može mjeriti su vodik i helij (koji su ispod masnog raspona masenog spektrometra), argon, dušik i kisik (koji su prisutni na visokim razinama iz plazme i zraka) te fluor i neon (koji se ne mogu ionizirati u argonskoj plazmi). Od tih "nemogućih" elemenata, čak se i fluor može analizirati neizravno pomoću trostrukog kvadrupolnog ICP-MS-a. Jedan od razloga zašto je ICP-MS tako široko korišten jest taj što pruža izuzetno niske granice detekcije za gotovo sve elemente koje može mjeriti. ICP-MS može detektirati elemente u vrlo niskim koncentracijama, ispod 0,1 dijela po bilijunu (ppt), kao i u visokim koncentracijama do 1000 dijelova na milijun (ppm), što je 0,1%. Raspon koncentracija koje može mjeriti kreće se od 0,1 ppt do 0,1%, obuhvaćajući 10 redova veličine. Nijedna druga tehnika nema tako širok raspon elemenata, niske granice detekcije i širok opseg mjerenja (48).

1.5.4. Princip rada ICP-MS

ICP-MS se obično koristi za analizu tekućih uzoraka. Otopina uzorka se pumpa u nebulizator, gdje se tekućina pretvara u fini sprej ili aerosolnu maglu pomoću mlaza argonskog plina. Aerosolna magla prolazi kroz komoru za prskanje, gdje se veće kapi uklanjaju. U plazmi koja se koristi u ICP-MS, ionizirani plin je argon, koji teče kroz kvarcnu cijev. Fine kapi nose argonski plinski tok prema ICP plazma baklji (Slika 4).



Slika 4. Skica principa rada ICP-MS

(preuzeto s <https://cdn.sanity.io/images/0vv8moc6/cnst/2f23e391869e554e75903da04a4100216565448e-2462x1000.jpg/NavigatingtheLab0423Figure1.jpg?fit=crop&auto=format>)

Izvor ionske plazme i maseni spektrometar sa četveropolnim masenim filtrom razdvojeni su vakuumskim dijelom koji prenosi ione iz plazme do masenog spektrometra. Nakon prolaska, ioni se fokusiraju u uski snop pomoću ionske "leće". Leća se sastoji od nekoliko metalnih ploča s podesivim naponima. Ploča s pozitivnim naponom odbija pozitivno nabijene ione, dok ploča s negativnim naponom privlači iste ione. Kombinacija ploča s različitim naponima koristi se za upravljanje i fokusiranje iona. Osim fokusiranja iona radi maksimiziranja transmisije i osjetljivosti, ionska leća također odvaja ione od neutralnih čestica i fotona izvađenih iz plazme. Ove ne nabijene čestice bi uzrokovale visoki pozadinski signal, stoga ih treba spriječiti da prođu kroz vakuumski sustav i dosegnu detektor. Većina ICP-MS instrumenata koristi kvadrupolni maseni spektrometar za filtriranje iona po masi, ili, preciznije, po omjeru mase i naboja (m/z). U svim ICP-MS instrumentima nakon prolaska kroz maseni separator, ioni udaraju u aktivnu površinu detektora koji elektronskom multiplikacijom proizvodi specifičan puls od kaskade elektrona. Proces se zatim ponavlja za druge analite od interesa koji su u potpunosti različitih masa. Ova tehnika snimanja svih

analita naziva se multielementarna analiza. Za povećanje preciznosti i eliminaciju potencijalnih varijacija, često se koriste interni standardi i kontrole kvalitete. Interni standardi su poznate koncentracije određenih elemenata koji se dodaju uzorku kako bi se pratila učinkovitost analize. ICP-MS se često koristi u područjima kao što su analize tragova, geokemija, okolišna istraživanja, medicinska istraživanja i druga područja gdje je potrebna visoka osjetljivost i preciznost u određivanju koncentracija elemenata (49).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje ima sljedeće ciljeve:

- istražiti akumulaciju teških metala u uzorcima samoniklih jestivih gljiva s različitim lokaliteta u RH te kultiviranih vrsta gljiva, kroz analizu njihovog mineralnog profila, analizom 11 elemenata (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) od kojih će biti ispitani neki teški metali (Pb, Cd, Hg, As, Cr i Al)
- utvrditi postoje li razlike u sastavu samoniklih jestivih gljiva u odnosu na geografsko i botaničko podrijetlo
- proučiti utjecaj geografskog i botaničkog podrijetla na sadržaj mikroelemenata i teških metala u gljivama
- provjeriti usklađenost utvrđenih vrijednosti teških metala s propisima zakonodavstva Republike Hrvatske i Europske unije o količini kontaminanata.
- procijeniti sigurnost jestivih gljiva i osigurati da njihova konzumacija ne predstavlja zdravstveni rizik za ljude

3. IZVORI PODATAKA I METODE

3.1. Ustroj studije i uzorci

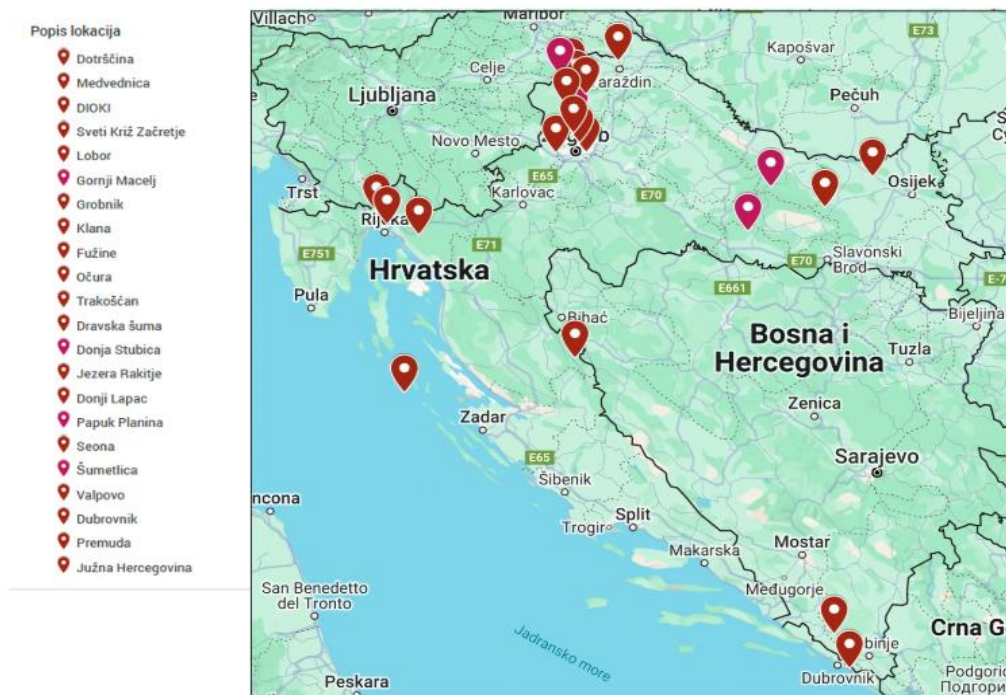
Ovim istraživanjem analizirano je ukupno 39 uzoraka jestivih gljiva, odnosno 34 uzorka samoniklih gljiva, te 5 uzoraka kultiviranih gljiva (tablica 1).

Tablica 1. Vrste i broj uzoraka samoniklih i kultiviranih gljiva korištenih u istraživanju

Skupina	Vrsta	Hrvatski naziv	Broj uzoraka
Samonikle	<i>Boletus edulis</i>	Vrganj	10
	<i>Craterellus cornucopioides</i>	Crna truba	9
	<i>Cantharellus cibarius</i>	Lisičarka	3
	<i>Macrolepiota procera</i>	Sunčanica	3
	<i>Lyophyllum decastes</i>	Stoglavka	1
	<i>Amanita rubescens</i>	Biserka	1
	<i>Laccaria Amethystina</i>	Ljubičasta gljivica	1
	<i>Morchella esculenta</i>	Pravi smrčak	1
	<i>Lactarius deliciosus</i>	Rujnica	1
	<i>Agaricus campestris</i>	Livadska pečurka	1
	<i>Trametes versicolor</i>	Puranov rep	1
	<i>Chroogomphus rutilus</i>	Borov čavlić	1
Uzgoj	<i>Imleria badia</i>	Baršunovac	1
	<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	1
	<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi	1
	<i>Hericium erinaceus</i>	Lavlja griva	1
	<i>Agaricus bisporus</i>	Šampinjon	1
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bukovača	1

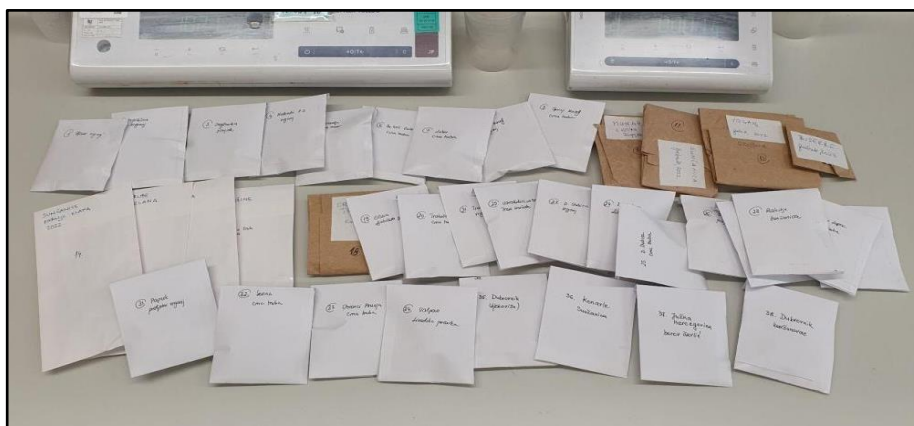
Uzorci samoniklih, jestivih gljiva, ubrani su na različitim lokalitetima u Hrvatskoj: Grad Zagreb i Zagrebačka županija (Medvednica - zagrebačka strana, Dotršćina, Žitnjak, Rakitje), Krapinsko-Zagorska županija (Medvednica, Sv. Križ Začretje, Lohor, Gornji Macelj, Očura, Donja Stubica), Varaždinska županija (Trakošćan, Varaždin), Požeško-slavonska županija (obronci Papuka i Psunja), Osječko baranjska županija (Seona, Valpovo), Primorsko-goranska županija (Grobnik, Klana, Fužine), Ličko-senjska županija (Donji Lapac), Zadarska županija (Premuda) te Dubrovačko-neretvanska županija (Dubrovnik, Konavle). Lokacije uzorkovanja samoniklih gljiva su prikazane na slici 5.

Lokacije ubranih gljiva



Slika 5. Lokaliteti prikupljenih uzoraka samoniklih gljiva (izvor: autor)

Uzorci su uzorkovani u periodu od travnja do studenoga 2023. godine. U uzorkovanju i sakupljanju uzoraka sudjelovali su volonteri gljivari i sakupljači gljiva s područja cijele Hrvatske. Gljive su sušene prirodno na suncu ili u dehidratoru i dostavljene u papirnatim omotima. Do analize uzorci su čuvani u kontroliranim uvjetima, na tamnom mjestu, u papirnatim omotima na sobnoj temperaturi (Slika 6).



Slika 6. Pohrana uzoraka gljiva u papirnatim omotima (izvor: autor)

Kultivirane gljive korištene u istraživanju donirane su iz obiteljske tvrtke Nolanea d.o.o. iz Jastrebarskog (shiitake - *Lentinula edodes*, reishi - *Ganoderma lucidum* i lavlja griva - *Hericium erinaceus*) te iz tvrtke Požežanec d.o.o iz Zagreba (šampinjoni - *Agaricus bisporus* i bukovače - *Pleurotus ostreatus*).

Na uzorcima samoniklih i kultiviranih vrsta gljiva izvršena je analiza svih elemenata tehnikom ICP-MS. Analiza je provedena na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" u Zagrebu, na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane.

3.2. Metode analize

Za potrebe analize uzoraka gljiva u ovom istraživanju, korištena je multielementarna tehnika masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), koja omogućuje precizno mjerenje koncentracije različitih metala. Prije analize, uzorci gljiva podvrgnuti su mikrovalnoj digestiji (slika 7). uz mokro spaljivanje kako bi se osiguralo potpuno izlučivanje elemenata iz uzoraka.

3.2.1. Priprema uzorka mokrim spaljivanjem uz mikrovalnu digestiju

Reagensi:

- Koncentrirana dušična kiselina (HNO_3), 65% suprapur (*Merck, Darmstadt, Njemačka*)

- Vodikov peroksid (H_2O_2), 40% p.a. (*Kemika, Zagreb*)
- Ultračista voda 18.2 M Ω /cm; Q Millipore (*Merck, Darmstadt, Njemačka*)

Potrošni materijal:

- Papir
- Staklene epruvete
- Plastična žlica
- Plastične kivete 50 ml

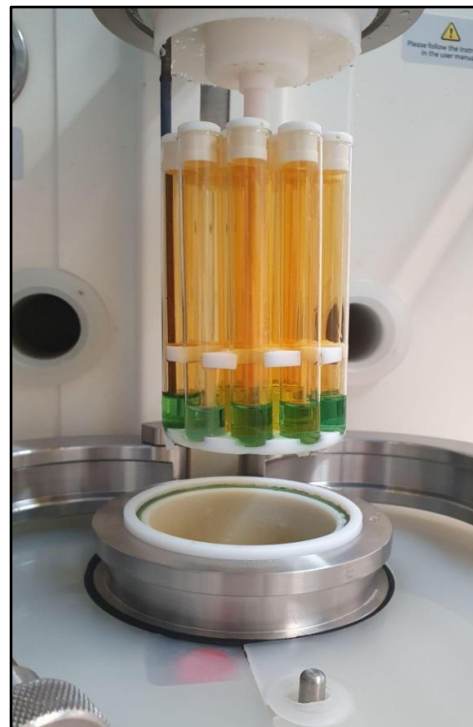
Oprema:

- Mikser (Nutribullet)
- Stakleni lijevak
- Analitička vaga (Kern ALJ 220-4, Njemačka)
- Automatske pipete (Eppendorf, Njemačka)
- Odmjerne tikvice 20, 25, 50, 100ml
- Dispensor 0,5 - 5ml (Brand GmbH, Njemačka)
- Uređaj za mikrovalnu digestiju (Milestone Srl, Italija) (Slika 7)

Suhi uzorci gljiva usitnjeni su mehaničkim mikserom (Nutribullet). Zatim je 0,2 g svakog uzorka pojedine vrste gljiva izvagano te prebačeno u staklenu epruvetu. Dispensorom je dodano po 3 mL koncentrirane dušične kiseline, te po 1 mL 40% vodikovog peroksida. Epruvete su zatvorene plastičnim čepom i prenesene u bubanj za mikrovalnu razgradnju (Slika 8). Prema izabranom programu u internoj radnoj uputi *RU-81-053*, izvršeno je mokro spaljivanje uzoraka uz mikrovalnu razgradnju. Nakon hlađenja, sadržaj epruvete je ispran deioniziranom vodom i prenesen u plastične kivete volumena 50 mL koje su zatim napunjene do oznake deioniziranom vodom te su pohranjene na sobnoj temperaturi do daljnje analize.



**Slika 7. Uređaj za mikrovalnu digestiju - Milestone Srl, Italija
(preuzeto s: <https://www.milestonesrl.com/products/microwave-digestion/ultrawave>)**



Slika 8. Uzorci prije i nakon mikrovalne razgradnje (izvor: autor)

3.2.2. Mjerenje koncentracije minerala i teških metala metodom ICP-MS

Oprema:

- Mikropipete 10 - 100 μL i 100 - 1000 μL (Eppendorf, Njemačka)
- Odmjerne tikvice 20, 25, 50, 100 mL A klase
- Dispensor 0,5 - 5 mL (Brand GmbH, Njemačka)
- Uređaj za mikrovalnu digestiju (Milestone Srl, Italija)
- ICP-MS Nexion (Perkin Elmer, SAD)

Reagensi:

- Argon $<99.9\%$
- HNO_3 60% (*Merck, Darmstadt, Njemačka*)
- Multielementna standardna otopina (*IV CertiPUR, Darmstadt, Njemačka*) koja sadrži u mg/L: 993 ± 10 Al, 992 ± 10 Ca, 990 ± 10 Cd, 997 ± 10 Co, 995 ± 10 Cu, 999 ± 10 Fe, 998 ± 10 K, 1000 ± 10 Mg, 1005 ± 10 Mn, 989 ± 10 Na, 999 ± 10 Ni, 994 ± 10 Pb, 994 ± 10 Zn

Mjerenje koncentracije obavljeno je na ICP-MS uređaju Nexion (Perkin Elmer, SAD) (slika 9), koji je opremljen staklenim koncentričnim nebulizatorom i kvarcnom komorom za raspršivanje Scott tipa, čime se osigurava efikasno raspršivanje uzorka u plazmu. Nakon što je uređaj uključen i stabiliziran u skladu s relevantnim uputama i protokolima, plazma generator postavlja temperaturu plazme na visoke razine između 6 000 i 10 000 $^{\circ}\text{C}$, što omogućava efikasnu atomizaciju i ionizaciju uzorka. Stakleni koncentrični nebulizator i kvarcna komora za raspršivanje Scott tipa postavljeni su na sobnu temperaturu kako bi se osigurala pravilna raspršenost uzorka. Ionski izvor održava temperaturu od 200 $^{\circ}\text{C}$, dok je temperatura kvadrupola postavljena na 150 $^{\circ}\text{C}$ za stabilnu selekciju iona prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Nakon toga se provodi mjerenje slijepa probe kako bi se osigurala točnost mjerenja i isključila mogućnost kontaminacije ili drugih pogrešaka. Za pripremu slijepih proba i otopina standarda koristi se 2% otopina dušične kiseline, koja se svakodnevno priprema u laboratoriju. Standardna otopina s poznatim koncentracijama elemenata (*IV CertiPUR, Darmstadt, Njemačka*) korištena je za kalibraciju uređaja. Nakon slijepa probe postavlja se kalibracijski pravac pomoću šest točaka, što pomaže u preciznom određivanju koncentracije elemenata. Sljedeći korak je mjerenje kontrolnog standarda

certificiranih referentnih materijala (CRM) kako bi se osigurala pouzdanost rezultata. Zatim se analiziraju pripremljeni uzorci.

Nakon mikrovalne razgradnje dobivena bistra otopina automatski se injektira u interfazni dio putem integriranog uzorkivača, a Universal Cell Technology (UCT) tehnologija korištena je za smanjenje interferencija uzrokovanih prisutnošću drugih iona. Ova tehnologija koristi reakcijske plinove koji selektivno uklanjaju ili smanjuju interferirajuće ione, čime se postiže preciznija analiza elemenata u tragovima. Uzorak se u uređaju prevodi u aerosol čiji se sastojci u vrućoj plazmi u potpunosti razlažu na svoje osnovne atome (ioniziraju se). Nakon svakog desetog uzorka, ponovno se izmjeri standard kako bi se potvrdila konzistentnost i točnost mjerenja. Posljednji korak u postupku je kvantifikacija, gdje se na temelju dobivenih podataka određuju koncentracije elemenata u uzorku. Koncentracija svakog elementa u uzorku određena je prema broju detektiranih iona. U masenom spektrometru, ioni se razdvajaju i identificiraju prema omjeru mase i naboja (m/z). Rezultati su obrađeni koristeći softver koji koristi kalibracijsku krivulju za preciznu kvantifikaciju koncentracija elemenata. Konačni rezultati su validirani prema standardima i prikazani u jedinicama $\mu\text{g/L}$.



Slika 9. ICP-MS Nexion (izvor: autor)

3.2.2.1. Kvantifikacija

Kvantifikacija rezultata mjerenja na instrumentu provedena je prema mjernoj jednadžbi:

$$Y = \frac{c_x \cdot I_{uz}}{I_s}$$

γ - koncentracija analita ($\mu\text{g/L}$)

C_{st} - koncentracija radnog standarda CRM ($\mu\text{g/L}$)

I_{uz} - intenzitet pojedinog elementa u uzorku (cps)

I_{st} - intenziteti radnog standarda CRM (cps)

3.2.2.2. Prikaz rezultata

Rezultat je srednja vrijednost tri uzastopna mjerenja uzorka, izražen u mg pojedinog metala na kilogram hrane (mg/kg).

$$w = V \cdot \frac{(c_1 - c_0)}{m}$$

w - masena koncentracija analita (mg/kg)

V - ukupni volumen pripremljenog uzorka (L)

m - masa uzorka (g)

C_0 - koncentracija slijepe probe u mg/L

C_1 - koncentracija uzorka u mg/L

Rezultati su prikazani u tablicama korištenjem programa Microsoft Word (Microsoft Office Standard, 2021.).

3.2.3. Statističke metode

Statistička analiza provedena je programom MedCalc, verzija 12.4.0.0.0.0. (*MedCalc Software*, Mariakerke, Belgija). Deskriptivna statistika korištena je za prikaz podataka koristeći program Microsoft Excel (*Microsoft Office Standard*, 2021.). Korištene su sljedeće statističke metode u Excelu: prosjek (AVERAGE), raspon (RANGE), minimalna vrijednost (MIN), i maksimalna vrijednost (MAX). Raspon je izračunat oduzimanjem minimalne vrijednosti od maksimalne.

4. REZULTATI

Koncentracije 11 elemenata ispitane su u 34 uzorka samoniklih gljiva te 5 uzoraka gljiva iz uzgoja. Vrste prikupljenih samoniklih gljiva i gljiva iz uzgoja te broj uzoraka svake pojedine vrste prikazan je u Tablici 1.

Izmjerene koncentracije olova i kadmija uspoređene su s maksimalnim dopuštenim vrijednostima za divlje gljive i gljive iz uzgoja koje su propisane Uredbom komisije EU o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2023/915) (50). Za ostale izmjerene metale izmjerene vrijednosti uspoređene su s podnošljivim tjednim unosom (PTWI, engl. *provisional tolerable weekly intake*) koje je predložila radna skupina svjetske organizacije JECFA (engl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*). JECFA je međunarodni znanstveni stručni odbor kojim zajednički upravljaju Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO). Za izračun procijenjenog tjednog unosa pretpostavljen je tjedni unos 210 g jestivih gljiva za osobe od 60 kg.

Prosječne koncentracije teških metala izmjerenih u uzorcima samoniklih gljiva i gljiva iz uzgoja te udio uzoraka koji su sadržavali količine više od propisanih, prikazane su u Tablicama 2. i 3. Usporedba koncentracija teških metala u različitim vrstama dana je u Tablici 5. Prema području na kojem su prikupljeni samonikle gljive su podijeljene na 9 regija: Grad Zagreb i Zagrebačka županija, Krapinsko-zagorska županija, Varaždinska županija, Požeško-slavonska županija, Osječko-baranjska županija, Primorsko-goranska županija, Ličko-senjska županija, Zadarska županija te Dubrovačko-neretvanska županija. Usporedba rezultata prema geografskom podrijetlu prikazana je u Tablici 6.

Rezultati iskorištenja za nikal iznose 70%, kadmij 76%, selenij 80%, olovo 84%, krom 111% te živu 118%. Ovi rezultati ukazuju na varijacije u učinkovitosti metode nacjepljivanja poznatom koncentracijom (tzv. spajkanja) za različite elemente, što može biti posljedica nekoliko čimbenika, uključujući moguće interferencije drugih tvari, gubitke tijekom pripreme uzorka ili pogreške u kalibraciji mjernih uređaja. Idealno iskorištenje bi bilo 100%, što bi značilo da se detektira točno onoliko analita koliko je dodano. U slučajevima kadmija, nikla, selenija i olova, detektirano je manje od dodane količine, što može ukazivati na neefikasnost

metode ili gubitke. Nasuprot tome, za krom i živu, detektirane količine su premašile dodane, što sugerira interferencije ili moguće greške u mjerenju. Ove informacije su ključne za procjenu i optimizaciju metode spajkanja kako bi se postigla veća točnost i pouzdanost u analitičkim postupcima.

Izračun procjene dnevnog (EDI) unosa proveden je prema formuli:

$$EDI (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{tjel. masa}/\text{dan}) = \frac{\text{koncentracija elemenata } (\mu\text{g}/\text{kg}) \times \text{količina obroka (kg)}}{\text{težina odrasle osobe (60 kg)}}$$

Za prosječnu količinu sušenih gljiva u obroku uzeto je 30 g.

Tablica 2. Koncentracije (mg/kg) minerala i teških metala u uzorcima sušenih jestivih samoniklih gljiva (N=34), prosječan dnevni unos EDI (μg/dan), prihvatljivi dnevni unos ADI (μg/kg) te prehrambene referentne vrijednosti PU (mg/dan)

Element	Prosjek(mg/kg)	Raspon	EDI(μg/dan/kg)	ADI(μg/kg)	PU(mg/dan)
Al	413,53	33,983 – 7005,855	206,765	300,0	-
As	0,34	0,004 – 1,743	0,17	<i>no safe level</i>	-
Cd	1,36	0,002 – 5,45	0,68	0,36	-
Cr	1,43	0,256 – 9,603	0,715	-	-
Cu	40,17	4,802 – 89,263	20,1	500,0	-
Fe	267,13	22,700 – 3767,740	133,57	-	8-18
Ni	1,35	0,010 – 5,628	0,675	2,0	-
Pb	0,92	0,007 – 6,013	0,46	<i>no safe level</i>	-
Se	10,04	0,543 – 47,548	5,02	0,7	-
Zn	99,79	17,826 – 520	49,9	-	8-11
Hg	2,10	0,021 – 13,055	1,05	0,57	-

Tablica 3. Koncentracije (mg/kg) teških metala u uzorcima sušenih gljiva iz uzgoja (N=5), prosječan dnevni unos EDI ($\mu\text{g}/\text{dan}$), prihvatljivi dnevni unos ADI ($\mu\text{g}/\text{kg}$) te preporučeni dnevni unos PU (mg/dan)

Element	Prosjek(mg/kg)	Raspon	EDI($\mu\text{g}/\text{dan}$)	ADI($\mu\text{g}/\text{kg}$)	PU(mg/dan)
Al	54	30-80	27	300,0	-
As	0.05	<0.03-0.09	0,025	<i>no safe level</i>	-
Cd	0.26	<0.01-0.76	0,13	0,36	-
Cr	0.21	0.17-0.3	0,105	-	-
Cu	14.08	7.34-21.9	7,4	500,0	-
Fe	42.60	24-67	21,3	-	8-18
Ni	0.16	0.1-0.23	0,08	2,0	-
Pb	0.04	<0.04-0.06	0,02	<i>no safe level</i>	-
Se	0.18	0.06-0.52	0,09	0,7	-
Zn	46.00	33-81	23	-	8-11

Za vrijednosti ispod razine detekcije pri izračunu korištena je granična vrijednost.

Tablica 4. Usporedba koncentracija teških metala prema različitim vrstama gljiva iz uzgoja. Iskazane su prosječne vrijednosti koncentracija u mg/kg

Vrsta	Al	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Se	Zn
<i>Lentinula edodes</i>	80	0,04	0,76	0,22	11,9	35	0,14	0,06	0,09	81
<i>Ganoderma lucidum</i>	60	<0,03*	0,12	0,17	21,9	34	0,23	<0,04*	0,06	33
<i>Hericium erinaceus</i>	40	<0,03*	0,21	0,17	7,34	53	0,1	<0,04*	0,09	33
<i>Agaricus bisporus</i>	60	0,08	<0,01*	0,17	21,1	24	0,15	<0,04*	0,52	48
<i>Pleurotus ostreatus</i>	30	0,09	0,18	0,3	8,15	67	0,16	<0,04*	0,12	35

* Ispod granice detekcije

Tablica 5. Usporedba koncentracija teških metala prema različitim vrstama jestivih samoniklih gljiva (zbog malog broja uzoraka i nenormalne distribucije, iskazane su prosječne vrijednosti koncentracija u mg/kg)

Vrsta (Broj uzoraka)	Al	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Se	Zn	Hg
<i>Boletus edulis</i> (10)	91.57	0.33	2.73	0.63	30.73	58.74	1.74	0.28	29.09	98.96	5.83
<i>Craterellus cornucopioides</i> (9)	1202.54	0.25	0.29	2.68	37.11	717.59	1.58	2.17	0.97	87.35	0.08
<i>Cantharellus cibarius</i> (3)	150.15	0.10	2.46	2.03	52.83	110.39	0.89	0.49	1.10	112.10	0.19
<i>Macrolepiota procera</i> (3)	86.79	0.61	0.69	0.34	82.20	99.13	0.52	1.51	3.15	80.12	1.56
<i>Lyophyllum decastes</i> (1)	103.78	0.004	0.01	0.48	28.10	31.30	0.01	0.01	20.17	60.50	0.59
<i>Amanita rubescens</i> (1)	563.45	0.18	0.88	2.99	49.14	505.71	1.79	0.55	2.30	100.49	0.36
<i>Laccaria Amethystina</i> (1)	135.77	1.74	0.22	0.71	45.49	156.34	0.57	0.42	0.76	51.49	0.02
<i>Morchella esculenta</i> (1)	124.64	0.17	2.39	1.63	20.96	185.52	1.22	0.53	0.69	89.82	0.08
<i>Lactarius deliciosus</i> (1)	141.46	0.22	1.03	0.85	38.94	105.80	1.57	0.51	0.71	75.14	0.41
<i>Agaricus campestris</i> (1)	54.68	0.97	0.71	0.47	56.67	56.30	0.71	0.22	2.64	104.47	5.33
<i>Trametes versicolor</i> (1)	277.38	0.08	1.08	1.15	10.71	206.44	0.62	0.22	0.67	20.80	0.11
<i>Chroogomphus rutilus</i> (1)	146.92	0.04	0.25	0.80	4.80	104.77	2.64	0.35	0.54	17.83	0.02
<i>Imleria badia</i> (1)	62.75	0.58	0.36	2.20	64.75	55.94	0.74	0.12	0.55	520.00	0.26

Masna slova označavaju povišene vrijednosti u odnosu na postavljene kriterije JECFA

Tablica 6. Usporedba teških metala prema geografskom podrijetlu uzorka samoniklih gljiva (*zbog malog broja uzoraka i nenormalne distribucije, iskazane su prosječne vrijednosti koncentracija u mg/kg*)

Područje		Al	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Se	Zn	Hg
Zagreb i zagrebačka ž. (4)	Prosjek	80.93	0.36	0.88	0.57	41.10	54.95	1.20	0.64	18.75	78.71	3.30
Krapinsko-zagorska (11)	Prosjek	168.85	0.36	0.94	0.76	37.34	151.60	1.03	0.97	6.11	81.30	1.97
Varaždinska županija (3)	Prosjek	103.38	0.13	2.37	0.99	44.16	119.19	1.37	0.24	8.77	100.48	0.46
Primorsko-goranska (5)	Prosjek	181.24	0.18	1.70	1.14	34.64	166.31	1.44	1.44	25.31	116.79	3.92
Požeško-slavonska (2)	Prosjek	709.12	0.50	1.62	2.47	43.36	397.00	1.91	0.93	8.79	87.41	3.54
Osječko-baranjska (2)	Prosjek	149.4	0.414	2.14	2.75	63.5	120.7	0.84	1.32	2.73	69.44	1.148
Zadarska županija (1)	Prosjek	90.2	0.092	3.39	0.55	73.7	76.3	0.20	0.09	0.60	192.70	0.071
Dubrovačko-neretvanska (4)	Prosjek	136.9	0.343	0.66	1.10	40.5	111.3	1.02	0.59	1.57	157.62	0.199
Ličko-Senjska županija (2)	Prosjek	3594.3	0.755	2.16	7.31	38.0	1948.1	3.19	1.94	2.16	62.77	0.288

Masna slova označavaju povišene vrijednosti u odnosu na postavljene kriterije JECFA

5. RASPRAVA

Analiza prisutnosti elemenata koji čine mineralni profil, te uključuje i teške metale u samoniklim jestivim gljivama s područja Hrvatske pokazuje značajne varijacije u njihovim koncentracijama, naročito olova, kadmija, aluminijska, željeza i žive. Usporedba izmjerenih koncentracija s maksimalnim dopuštenim vrijednostima propisanim Uredbom komisije EU o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata, te s podnošljivim tjednim unosom (PTWI) koji je predložilo međunarodni zdravstveni stručni odbor JECFA, otkriva potencijalne rizike za zdravlje ljudi.

Olovo

Prema Uredbi komisije EU o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2023/915) (50), maksimalna dopuštena koncentracija olova u sušenim gljivama je 0.8 mg/kg. U 2 od 13 vrsta ispitanih gljiva, izmjerena je koncentracija olova veća od dopuštenih kriterija (*Craterellus cornucopioides* 2,17 mg/kg i *Macrolepiota procera* 1,51 mg/kg), što se vidi u tablici 5. i čini otprilike 15%. Prema geografskoj lokaciji, povećana koncentracija olova pronađena je u 5 od 9 ispitanih županija, što iznosi 56%. Najviše olova u prosjeku pronađeno je u gljivama iz Ličko-senjske županije (Donji Lapac) s prosječnom koncentracijom od 1.94 mg/kg, što je znatno iznad dopuštene razine. Ove vrijednosti ukazuju na značajan rizik konzumacije tih gljiva, posebno za osobe koje ih konzumiraju redovito.

U sličnom istraživanju koje su proveli An i suradnici u uzorcima gljiva iz Južne Koreje (54), najviša koncentracija olova izmjerena je u vrsti gljive *Umbilicaria esculenta* i iznosila je 12,3 mg/kg. Razine olova u drugim analiziranim gljivama kretale su se od 0.004 do 0.54 mg/kg. Prethodni podaci izvještavaju o najvišoj izmjerenoj koncentraciji olova u samoniklim jestivim gljivama od 16.41 mg/kg za vrstu *Umbilicaria esculenta* u radu Choi-a i suradnika, također iz Južne Koreje (55). Razine olova koje su prijavljene u drugim publikacijama bile su 10.18 mg/kg za vrstu *Russula vinosa* u Kini i 1.80 mg/kg u divljim gljivama iz Turske (56,57). Navedeni rezultati upućuju kako su utvrđene vrijednosti olova u RH ipak višestruko niže od onih u sličnim istraživanjima drugih autora iz drugih država.

Kadmij

Dozvoljena koncentracija kadmija u sušenim gljivama prema Uredbi komisije EU o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2023/915) (50) je 0.5 mg/kg. U tablici 5., rezultati pokazuju da je u 8 od 13 vrsta gljiva izmjerena veća koncentracija kadmija u odnosu na postavljene kriterije. Redom su to: *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Macrolepiota procera*, *Amanita rubescens*, *Morchella esculenta*, *Lactarius deliciosus*, *Agaricus campestris* te *Trametes versicolor*. Najveća koncentracija kadmija izmjerena je u vrsti *Boletus edulis* čija je prosječna vrijednost iznosila 2.73 mg/kg. Prema geografskom podrijetlu, na području svih županija izmjerena je povećana koncentracija kadmija, što prikazuje tablica 6. Najveća koncentracija kadmija pronađena je u samoniklim gljivama na području Varaždinske županije (Očura, Trakošćan, Varaždin uz rijeku Dravu) s prosječnom vrijednošću od 2.37 mg/kg. Ove vrijednosti su značajno iznad dopuštenih granica te ukazuju na potrebu za monitoringom i potencijalnim ograničenjem konzumacije ovih gljiva.

Prema istraživanju An-a i suradnika iz Koreje (54), najviša izmjerena koncentracija kadmija bila je u uzorcima sušenih gljiva vrste *Agaricus blazei* te je iznosila je 5,8 mg/kg. Razine kadmija u drugim analiziranim gljivama kretale su se od 0.05 do 0.68 mg/kg. Prethodno prijavljene razine kadmija u gljivama značajno su varirale: 13.8 mg/kg za gljivu *Pleurotus ostreatus* u Kini, 3.37 mg/kg za *Tricholoma matsutake* također u Kini (58,59) te 3.37 mg/kg za divlje sušene gljive u Turskoj (57). Ovi rezultati upućuju kako su utvrđene vrijednosti kadmija u RH, iako povišene, još uvijek značajno niže od onih u sličnim istraživanjima drugih autora.

Aluminij

Za aluminij nema propisane maksimalne dopuštene koncentracije u citiranoj EU Uredbi, međutim prema međunarodnom zdravstvenom stručnom odboru JECFA, tolerantan tjedni unos (TWI) iznosi 1 mg/kg tjelesne težine. Najviša koncentracija aluminija izmjerena je u prosjeku u uzorcima crne trube (*Craterellus cornucopioides*) s vrijednošću od 1202.54 mg/kg. Ako osoba konzumira 210 g tih gljiva u vremenskom okviru od tjedan dana, unijeti će 252,53 mg aluminija, što je znatno više od dopuštenog tjednog unosa prema podacima JECFA od 60 mg za osobu težine 60 kg (51). Najveća koncentracija aluminija pronađena je u uzorku crne trube s lokaliteta Donji Lapac, 7005.9 mg/kg. Ovi podaci sugeriraju značajan rizik prekomjernog unosa aluminija kroz konzumaciju crne trube. Najveća koncentracija aluminija prema geografskoj lokaciji pronađena je u uzorcima gljiva iz Ličko-senjske županije.

Željezo

Najviša prosječna koncentracija željeza također je pronađena u uzorcima crne trube (*Craterellus cornucopioides*) i iznosi 717.59 mg/kg. Prema geografskom podrijetlu, najveća koncentracija željeza pronađena je u uzorku crne trube s lokaliteta Donji Lapac, 3767,7 mg/kg, dok je najmanja koncentracija željeza bila u uzorku crne trube s obronka Psunja 63,0 mg/kg. Prema preporučenim dnevnim unosima međunarodnog zdravstvenog stručnog odbora JECFA za pokrivanje potreba 95% populacije, PU za željezo iznosi 16 mg/dan (52). Ako gledamo prosječnu vrijednost koncentracije željeza u vrsti gljive crna truba (*Craterellus cornucopioides*), dnevna konzumacija 30 g te gljive unosi 21,53 mg željeza, što je također nešto više iznad preporučenih vrijednosti. Najveća koncentracija željeza prema geografskoj lokaciji pronađena je u uzorcima gljiva iz Ličko-senjske županije.

U istraživanju iz Kine, Huanga i suradnika, izmjerene koncentracije željeza u uzorcima jestivih gljiva kretale su se od 46,3 do 2514 mg/kg (58), dok se u istraživanju u Turskoj, Türkmena i suradnika, raspon željeza u uzorcima gljiva kretao od 97.2 do 3919 mg/kg (57).

Živa

Najviše žive u prosjeku izmjereno je u uzorcima vrganja (*Boletus edulis*) s prosječnom koncentracijom od 5.83 mg/kg. Prema geografskom lokalitetu, najviše žive pronađeno je u uzorku vrganja iz Donje Stubice, u kojem je izmjerena koncentracija žive od 13.05 mg/kg, dok je najmanja koncentracija žive izmjerena u uzorku vrganja u okolini dvorca Trakošćan te iznosi 1,28 mg/kg. Tolerantni tjedni unos (PTWI) za metil-živu iznosi 1.6 µg/kg tjelesne težine, dok za anorgansku živu iznosi 4 µg/kg. Ako uzmemo prosječnu koncentraciju žive u uzorcima vrganja, tjednom konzumacijom 210 g vrganja, osoba od 60 kg unijeti će 1223 µg žive tjedno, a konzumacijom vrganja s najvećom koncentracijom žive unos bi bio 2743 µg, što je iznad dopuštenog unosa (96 µg tjedno) (53). Ove vrijednosti ukazuju na značajan rizik za zdravlje pri konzumaciji vrganja iz određenih područja (primarno Krapinsko-zagorske županije), ali i taj podatak je potrebno dokazati u budućim istraživanjima te na puno većem broju uzoraka za analizu, te kroz barem dvije sezone, odnosno kroz dulji period praćenja uslijed klimatoloških različitosti kroz godine sakupljanja uzoraka.

Rezultati istraživanja sukladni su prethodnom istraživanju Širića i suradnika iz 2017. godine, gdje je također najviša koncentracija žive s područja Žumberka utvrđena u vrstama roda

Boletus (1.32 mg/kg) (60) te u istraživanju iz Španjolske, Melgara i suradnika također u vrsti roda *Boletus* (6,9 mg/kg u klobuku i 4.5 mg/kg u stručku) (61).

Kultivirane gljive iz uzgoja

Razina metala značajno je veća u samoniklim jestivim gljivama nego u kultiviranim vrstama. To je dokazano i u istraživanju. U kultiviranim vrstama niti jedna vrsta gljiva nije premašivala maksimalnu dozvoljenu koncentraciju bilo kojeg od ispitivanih metala. Također, prosječnom tjednom konzumacijom tih gljiva nije utvrđen rizik za zdravlje niti kod jedne vrste. To je zbog toga što kultivirane gljive rastu u kontroliranim uvjetima s pažljivo nadziranom sastavom tla. Samonikle gljive mogu akumulirati metale iz prirodnog okoliša, što može biti korisno ako se primjene za pročišćavanje onečišćenog tla od teških metala, ali i potencijalno štetno ako se konzumiraju u velikim količinama ili iz zagađenih područja. Stoga je važno biti svjestan izvora i kvalitete gljiva koje konzumiramo.

Mikroelementi: selenij i cink

Što se tiče nutritivnih elemenata važnih za ljudsku prehranu, od važnosti za ljudsko zdravlje možemo izdvojiti selenij i cink kao važne mikroelemente za jačanje imuniteta, rast i razvoj. Iako možemo zaključiti da su kultivirane gljive znatno sigurnije za konzumaciju što se tiče teških metala, ovom istraživanju jasno se vidi da je izmjerena koncentracija selenija u samoniklim gljivama znatno veća od kultiviranih. Prosječna koncentracija selenija u jestivim samoniklim gljivama iznosi 99.79 mg/kg, dok je prosječna koncentracija selenija u kultiviranim vrstama iznosila 0.176 mg/kg, što je otprilike 500 puta manje.

Za razliku od cinka, čija je izmjerena prosječna koncentracija u jestivim samoniklim gljivama bila 2.10 mg/kg, dok je kod kultiviranih vrsta iznosila 46 mg/kg što je 20 puta više. Međutim, kultivirane vrste gljiva značajno se razlikuju od samoniklih, stoga bi trebalo provesti mjerenja na istim vrstama gljiva, i samoniklim i uzgojenim, kako bi se potvrdila ova tvrdnja.

6. ZAKLJUČAK

- Samonikle gljive mogu akumulirati metale iz okoliša, stoga je važno biti svjestan izvora i kvalitete gljiva koje se konzumiraju.
- Od 13 vrsta ispitanih gljiva, u 2 vrste (15%) izmjerena je koncentracija olova veća od dopuštenih kriterija. Najveća koncentracija olova pronađena je u vrsti *Craterellus cornucopioides* te iznosi 2,17 mg/kg. Prema geografskom lokalitetu, od ispitanih 9 županija, u 5 županije izmjerena je veća koncentracija olova od dopuštenih vrijednosti (0,8 mg/kg) s najvišim koncentracijama u Ličko-senjskoj županiji.
- Od ukupno 13 ispitanih vrsta gljiva, u njih 8 (62%) su koncentracije kadmija prelazile dopuštene vrijednosti (0,5 mg/kg). Najveća koncentracija kadmija izmjerena je u vrsti *Boletus edulis* čija prosječna vrijednost iznosi 2.73 mg/kg. Od 8 ispitanih lokaliteta (županija), u svim županijama izmjerene su veće koncentracije kadmija od dopuštene vrijednosti sigurne za konzumaciju. Najveće koncentracije kadmija izmjerene su u uzorcima gljiva iz Varaždinske županije. Ove vrijednosti ukazuju na potrebu za praćenjem toga kontaminanta i mogućim ograničenjem konzumacije.
- Najveća koncentracija aluminijska izmjerena je u uzorcima crne trube (*Craterellus cornucopioides*). Najveća koncentracija aluminijska prema geografskoj lokaciji pronađena je u uzorcima gljiva iz Ličko-senjske županije.
- Najveće koncentracije žive izmjerene su u uzorcima vrganja (*Boletus edulis*). Prema geografskom lokalitetu, najviše žive pronađeno je u uzorcima iz Primorsko-goranske županije.
- Najveća koncentracija željeza također je bila u uzorcima crne trube (*Craterellus cornucopioides*), s unosom koji može prelaziti preporučene dnevne vrijednosti ako se konzumira u većim količinama. Prema geografskom lokalitetu, najveće koncentracije željeza izmjerene su u Ličko-senjskoj županiji.
- Kultivirane gljive (iz uzgoja) ne pokazuju rizik od prekomjernog unosa metala, jer rastu u kontroliranim uvjetima.
- Analiza prisutnosti teških metala u samoniklim jestivim gljivama na području Hrvatske ukazuje na značajne varijacije u koncentracijama olova, kadmija, aluminijska, željeza i žive.
- Posebno zabrinjavaju visoke koncentracije olova i kadmija koje su pronađene u određenim regijama, što može predstavljati rizik za zdravlje konzumenata. Također,

visoke razine aluminija i žive zahtijevaju pažnju i daljnja istraživanja kako bi se osigurala sigurnost konzumacije ovih gljiva.

- Geološko podrijetlo značajno utječe na sadržaj teških metala i minerala u samoniklim jestivim gljivama. Razlike u koncentracijama olova, kadmija, aluminija, željeza i žive između različitih geografskih područja Hrvatske ukazuju na to da sastav tla i okolišni uvjeti igraju ključnu ulogu u akumulaciji tih elemenata u gljivama, za razliku od gljiva iz kontroliranog uzgoja koje imaju znatno niže razine tih metala zbog pažljivo nadziranih uvjeta rasta. Također, nasuprot tome, koncentracije nekih esencijalnih mikronutrijenata poput selenija više su u samoniklim jestivim gljivama u odnosu na kultivirane
- Uočljiv je utjecaj botaničkog podrijetla na sadržaj mikroelemenata i teških metala u gljivama, jer različite vrste gljiva imaju različitu sposobnost akumulacije teških metala i minerala. Određene vrste gljiva u ovom istraživanju, poput *Craterellus cornucopioides* ili *Boletus edulis*, akumulirale su više specifičnih metala kao što su aluminij, željezo, ili živa u usporedbi s drugim vrstama. To pokazuje da sposobnost akumulacije teških metala nije samo rezultat geološkog podrijetla (sastav tla), već i botaničkog podrijetla, odnosno inherentnih osobina različitih vrsta gljiva.
- Ove rezultate trebalo bi potvrditi u budućim istraživanjima na većem broju uzoraka samoniklim gljiva, naročito u nekim vrstama te regijama RH koje nisu bile značajno zastupljene u ovom istraživanju.

7. LITERATURA

1. Bosi, F., Biagioni, C., & Oberti, R. On the Chemical Identification and Classification of Minerals. MDPI. 2019 Sep; 9(10): 591.
2. Povarennykh, A. S. Crystal Chemical Classification of Minerals. Ilustrirano izdanje. New York: Springer US; 2014. 16-60.
3. Kolesnikov, S., Minnikova, T., Kazeev, K., Akimenko, Y., & Evstegneeva, N. Assessment of the ecotoxicity of pollution by potentially toxic elements by biological indicators of haplic chernozem of Southern Russia (Rostov region). Water, Air, & Soil Pollution. 2022 Jan; 233(1): 18
4. Dario Lasić. Utjecaj zemljopisnog podrijetla na peludni spektar i sadržaj flavonoida i minerala u medu (disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2012. 19-28.
5. Karcioğlu, O., & Arslan, B. Poisoning in the modern world: new tricks for an old dog?. BoD—Books on Demand. 2019. 27-30
6. Filipović, I., & Lipanović, S. Opća i anorganska kemija - I. i II. dio. Školska knjiga. 1995. 245
7. Gadd, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. In The Genus *Aspergillus*. F.E.M.S. Symposium Series; 1994. str. 361-374
8. Iskra, R. Y., & Fedoruk, R. S. Chromium, its properties, transformation, and impact on humans. Physiological Journal/Fiziologichnyi Zhurnal. 2022; 68(4): 202268.
9. DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., & Furini, A. Nutrient metal elements in plants. Metallomics; 2014 Aug; 6(10): 1770-1788.
10. Furini, A. Plants and Heavy Metals. Ilustrirano izdanje. New York: Springer; 2012.

11. Begum, W., Rai, S., Banerjee, S., Bhattacharjee, S., Mondal, M. H., Bhattacharai i sur. comprehensive review on the sources, essentiality and toxicological profile of nickel. RSC advances. 2022, Mar; 12(15): 9139-9153.
12. Haydon, M. J., & Cobbett, C. S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. New phytologist. 2007, Mar; 174(3): 499-506.
13. Jomova, K., Makova, M., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K. i sur. Essential metals in health and disease. Chemico-biological interactions. 2022, November; 367: 110173.
14. Hanikenne, M., Esteves, S. M., Fanara, S., & Rouached, H. Coordinated homeostasis of essential mineral nutrients: a focus on iron. Journal of experimental botany. 2020 Nov; 72(6): 2136-2153.
15. Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., & Nurchi, V. M. The essential metals for humans: a brief overview. Journal of inorganic biochemistry. 2019, Jun; 195: 120-129.
16. Chasapis, C. T., Ntoupa, P. S. A., Spiliopoulou, C. A., & Stefanidou, M. E. Recent aspects of the effects of zinc on human health. Archives of toxicology. 2020, May; 94: 1443-1460.
17. Zgorelec, Ž., Vujnović, A., Prevendar Crnić, A., & Medunić, G. Biotehnološke metode bioremedijacije selena iz raznih dijelova okoliša: pregled. Journal of Central European Agriculture. 2023, lip; 24(2): 531-551.
18. Exley, C., & House, E. R. Aluminium in the human brain. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly. 2011 Jun; 142(4): 357-363.
19. Nurchi, V. M., Buha Djordjevic, A., Crisponi, G., Alexander, J., Bjørklund, G., & Aaseth, J. Arsenic toxicity: molecular targets and therapeutic agents. Biomolecules. 2020, Feb; 10(2): 235.

20. Hughes, M.F.; Beck, B.D.; Chen, Y.; Lewis, A.S.; Thomas, D.J. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol. Sci.* 2011, Jul; 123(2): 305–332.
21. Gomes, C. S., & Silva, E. A. Health benefits and risks of minerals: bioavailability, bio-essentiality, toxicity, and pathologies. Cham: Springer International. In *Minerals Latu Sensu and Human Health: Benefits, Toxicity and Pathologies*. 2021. str. 81-179.
22. Chakraborty, R., Renu, K., Eladl, M. A., El-Sherbiny, M., Elsherbini, D. M. A., Mirza, A. K. i sur. Mechanism of chromium-induced toxicity in lungs, liver, and kidney and their ameliorative agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022, Jul; 151: 113119.
23. Iyer, M., Anand, U., Thiruvengataswamy, S., Babu, H. W. S., Narayanasamy, A., Prajapati, V. K. i sur. A review of chromium (Cr) epigenetic toxicity and health hazards. *Science of the Total Environment*. 2023, Jul, 882: 163483.
24. Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. The effects of cadmium toxicity. *International journal of environmental research and public health*. 2020 May; 17(11): 3782.
25. Zhu, J., Huang, Z., Yang, F., Zhu, M., Cao, J., Chen, J., i sur. Cadmium disturbs epigenetic modification and induces DNA damage in mouse preimplantation embryos. *Ecotoxicol. Environ.* 2021 Aug; 219: 112306.
26. Chatzi, L., Ierodiakonou, D., Margetaki, K., Vafeiadi, M., Chalkiadaki, G., Roumeliotaki, T., i sur. Associations of prenatal exposure to cadmium with child growth, obesity, and cardiometabolic traits. *Am. J. Epidemiol.* 2019 Sep; 188(1):141–150.
27. Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Maqsood, M., Hussain, M., Ishfaq, M. i sur. Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of environmental management*. 2019 Nov; 250: 109557.

28. Charkiewicz, A. E., & Backstrand, J. R. Lead toxicity and pollution in Poland. *International journal of environmental research and public health*. 2020 Jun; 17(12): 4385.
29. Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, j. A. Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary toxicology*. 2015 Mar ; 8(2), 55-64.
30. Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*. 2020 Apr; 245: 125586.
31. Carocci, A., Rovito, N., Sinicropi, M. S., & Genchi, G. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 2014; Str 1-18.
32. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*. 2014 Jun; 7(2), 60-72.
33. Bahram, M., & Netherway, T. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*. 2022 Dec; 46(2): 58.
34. Webster, J., & Weber, R. *Introduction to fungi*. 3. izd. UK: Cambridge university press; 2007. str 10-12.
35. Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*. 2019 Oct; 94(6): 2101-2137.
36. Minter, D. W., & Soliman, G. S. *Fomitopsis betulina*. *Descriptions of Fungi and Bacteria*. 2021 Dec; 230: 2294.
37. Özcan, M. M., Dursun, N., & Juhaimi, F. Y. A. Heavy metals intake by cultured mushrooms growing in model system. *Environmental monitoring and assessment*. 2013 Apr; 185: 8393-8397.

38. Priyadarshini, E., Priyadarshini, S. S., Cousins, B. G., & Pradhan, N. Metal-Fungus interaction: Review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. *Chemosphere*. 2021 Jul; 274: 129976.
39. Malik, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 2004 Apr; 30(2): 261-278.
40. Mleczek, M., Niedzielski, P., Kalač, P., Budka, A., Siwulski, M., Gąsecka, M., i sur. Multielemental analysis of 20 mushroom species growing near a heavily trafficked road in Poland. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016 May; 23: 16280-16295.
41. Kumar, A., Chaturvedi, A. K., Yadav, K., Arunkumar, K. P., Malyan, S. K., Raja, P., i sur. Fungal phytoremediation of heavy metal-contaminated resources: current scenario and future prospects. *Recent advancement in white biotechnology through fungi*. Vol 3: Perspective for sustainable environments. 2019. str 437-461.
42. Božac, R. *Gljive – morfologija, sistematika i toksikologija*. 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2021.
43. Falandysz, J., Zhang, J., Wang, Y.-Z., Saba, M., Krasieńska, G., Wiejak, A. i sur. Evaluation of Mercury Contamination in Fungi *Boletus* Species from Latosols, Lateritic Red Earths, and Red and Yellow Earths in the Circum-Pacific Mercuriferous Belt of Southwestern China. *PLoS One*. 2015 Nov; 10 (11): e0143608.
44. Boruh, A. Tridip, I sur. "Craterellus cornucopioides (L.)/Craterellus odoratus (Schwein.)." *Phytochemistry and Nutritional Composition of Significant Wild Medicinal and Edible Mushrooms: Traditional Uses and Pharmacology*; 2023 str. 142-214.

45. Singh, Ravinder Pal, I sur. "Morphological Characterization of Some Wild Macrofungi of Gorakhpur District, UP, India." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016 Dec; 5(12): 207-218.
46. Nóbrega, J. A., Pirola, C., Fialho, L. L., Rota, G., de Campos Jordão, C.E.K.M.A., & Pollo, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: how simple can it become? *Talanta*. 2012 Aug; 98: 272-276.
47. Structure and Principle of the microwave digestion. [Mrežne stranice] Raykolgroup; [citirano 2024. lipanj]. Dostupno na: <https://www.raykolgroup.com/structure-and-principle-of-the-microwave-digester.html>
48. A Beginner's Guide to ICP-MS, Mass Spectrometry basics. [Mrežne stranice] Agilent; [citirano 2024. lipanj]. Dostupno na: <https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/what-is-icp-ms-icp-ms-faqs>
49. Wilschefski SC, Baxter MR. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev*. 2019 Aug; 40(3):115-133.
50. Regulation - 2023/915 - EN - EUR-Lex. EUR-Lex.europa.eu. [Mrežne stranice] 2023; [citirano 2024. lipanj]. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>
51. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials on a request from European commission on Safety of aluminium from dietary intake. *The EFSA Journal*. 2008 Jul; 754: 1–34.
52. EFSA NDA Panel of EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *The EFSA Journal*. 2015 Oct; 13(10): 4254

53. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *The EFSA Journal*. 2012 Dec; 10(12): 2985.
54. An, J. M., Gu, S. Y., Kim, D. J., Shin, H. C., Hong, K. S. i sur. Arsenic, cadmium, lead, and mercury contents of mushroom species in Korea and associated health risk. *International Journal of Food Properties*. 2020 May; 23(1): 992-998.
55. Choi, Hoon, et al. "Risk assessment of lead and cadmium through mushrooms." *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2012 Aug; 44(6): 666-672.
56. Liu, S., Liu, H., & Wang, Y. Research Progress on Elements of Wild Edible Mushrooms. *Journal of Fungi*. 2022 Sep; 8(9): 964.
57. Türkmen, Mustafa, and Derya Budur. "Heavy metal contaminations in edible wild mushroom species from Turkey's Black Sea region." *Food chemistry*. 2018 Jul; 254: 256-259.
58. Huang, Q., Jia, Y., Wan, Y., Li, H., & Jiang, R. Market survey and risk assessment for trace metals in edible fungi and the substrate role in accumulation of heavy metals. *Journal of Food Science*. 2015 Jun; 80(7): H1612-H1618.
59. Li, Qiang, et al. "Mineral constituents of a prized edible mushroom (*Tricholoma matsutake*) and soils beneath the fruiting bodies from the production areas across China." *Journal of Mountain Science*. 2016 Nov; 13: 2046-2052.
60. Širić, Ivan, et al. "Akumulacija kadmija i žive u jestivim saprotrofnim i ektomikoriznim gljivama." *Glasnik Zaštite Bilja*. 2017; 40(5): 50-58.
61. Melgar, M. J., Alonso, J., & García, M. A. Mercury in edible mushrooms and underlying soil: bioconcentration factors and toxicological risk. *Science of the Total Environment*. 2009 Oct; 407(20): 5328-5334.

62. Falandysz, J., K. Lipka, and A. Mazur. "Mercury and its bioconcentration factors in Fly Agaric (*Amanita muscaria*) from spatially distant sites in Poland." *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2007 Oct; 42(11): 1625-1630.

Popis tablica:

Tablica 1. Vrste i broj uzoraka gljiva analiziranih u ovom istraživanju.....	21
Tablica 2. Koncentracije (mg/kg) minerala i teških metala u uzorcima sušenih jestivih samoniklih gljiva.....	30
Tablica 3. Koncentracije (mg/kg) teških metala u uzorcima sušenih gljiva iz uzgoja.....	31
Tablica 4. Usporedba koncentracija teških metala prema različitim vrstama gljiva iz uzgoja.....	31
Tablica 5. Usporedba koncentracija teških metala prema različitim vrstama jestivih samoniklih gljiva.....	32
Tablica 6. Usporedba teških metala prema geografskom podrijetlu uzorka samoniklih gljiva.....	33

Popis slika:

Slika 1. Pravi vrganj (<i>Boletus edulis</i>).....	13
Slika 2. Crna truba (<i>Craterellus cornucopioides</i>).....	14
Slika 3. Crna truba (<i>Craterellus cornucopioides</i>).....	14
Slika 4. Skica principa rada ICP-MS.....	18
Slika 5. Lokaliteti prikupljenih uzoraka samoniklih gljiva.....	22
Slika 6. Pohrana uzoraka u papirnatim omotima.....	23
Slika 7. Uređaj za mikrovalnu razgradnju.....	25
Slika 8. Uzorci prije i nakon mikrovalne razgradnje.....	25
Slika 9. ICP-MS Nexion.....	27

8. SAŽETAK

Analiza teških metala I mineralnog sastava jestivih gljiva ICP-MS tehnikom

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je analizirati akumulaciju teških metala u uzorcima samoniklih jestivih gljiva s različitih lokaliteta u Hrvatskoj, kao i u kultiviranim vrstama gljiva te analizirati njihov mineralni profil. Ispitano je 11 elemenata, uključujući teške metale poput olova (Pb), kadmija (Cd), žive (Hg), arsena (As), kroma (Cr) i aluminija (Al). Istraživanje je imalo za cilj utvrditi razlike u sastavu gljiva u odnosu na njihovo geografsko i botaničko podrijetlo, proučiti utjecaj podrijetla na sadržaj mikroelemenata, te procijeniti sigurnost jestivih gljiva u skladu sa regulativom Republike Hrvatske i Europske unije.

Metode: U istraživanju je analizirano 39 uzoraka jestivih gljiva, od čega 34 uzorka samoniklih i 5 uzoraka kultiviranih gljiva. Uzorci su prikupljeni u periodu od travnja do studenoga 2023. godine s različitih lokaliteta diljem Hrvatske. Prikupljanje uzoraka organizirano je u suradnji s volonterima, gljivarima i sakupljačima gljiva, koji su osigurali reprezentativne uzorke iz svih dijelova zemlje. Posebna pažnja posvećena je odabiru gljiva s različitim geografskim i ekološkim karakteristikama kako bi se obuhvatile moguće varijacije u akumulaciji metala. Analiza svih uzoraka provedena je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo “Dr. Andrija Štampar” u Zagrebu, na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane. Korištena je napredna multielementarna tehnika masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), koja omogućuje precizno mjerenje koncentracija 11 elemenata, uključujući teške metale kao što su olovo, kadmij, živa, arsen, krom i aluminij. Prije same analize, uzorci gljiva podvrgnuti su mikrovalnoj digestiji, koja uključuje mokro spaljivanje uzoraka u prisutnosti kiselina kako bi se osiguralo potpuno oslobađanje i ekstrakcija elemenata. Ovaj korak je ključan za točnost i pouzdanost rezultata jer omogućuje razgradnju organskih materijala i oslobađanje vezanih metala. Nakon pripreme, uzorci su analizirani tehnikom ICP-MS, što je omogućilo detekciju i kvantifikaciju elemenata na vrlo niskim koncentracijama.

Rezultati: Analiza je pokazala značajne varijacije u koncentracijama teških metala među uzorcima. Rezultati istraživanja pokazali su značajne varijacije u koncentracijama teških metala u analiziranim uzorcima gljiva. U dvjema vrstama gljiva, crna truba (*Craterellus cornucopioides*) i sunčanica (*Macrolepiota procera*), izmjerene su koncentracije olova iznad

dopuštene granice od 0,8 mg/kg, s najvišom vrijednošću od 1,44 mg/kg u gljivama iz Primorsko-goranske županije. Kadmij je pronađen u koncentracijama iznad dozvoljenih 0,5 mg/kg, pri čemu je najviša vrijednost iznosila 2,37 mg/kg u gljivama iz Varaždinske županije. Aluminijs je zabilježen u visokoj koncentraciji od 1202,54 mg/kg u uzorcima *Craterellus cornucopioides*, što sugerira rizik od prekomjernog unosa ovog metala. Željezo je također pronađeno u visokim koncentracijama, s maksimalnom vrijednošću od 3767,7 mg/kg u vrsti *Craterellus cornucopioides*. Najviša koncentracija žive, 13,05 mg/kg, zabilježena je u vrganju (*Boletus edulis*) iz Donje Stubice, što značajno premašuje dopušteni tjedni unos. Kultivirane gljive pokazale su niže koncentracije teških metala u odnosu na samonikle, što potvrđuje njihovu sigurnost za konzumaciju. Ipak, u samoniklim gljivama izmjerena je viša koncentracija selenija (99,79 mg/kg), dok su kultivirane gljive pokazale višu koncentraciju cinka (46 mg/kg).

Zaključak: Istraživanje je pokazalo da samonikle gljive akumuliraju teške metale, pri čemu geografsko i botaničko podrijetlo značajno utječu na njihov sadržaj. U određenim regijama Hrvatske otkriveni su povišene vrijednosti olova, kadmija, aluminijsa i žive, što može predstavljati zdravstveni rizik za konzumente. Nasuprot tome, gljive iz kontroliranog uzgoja imaju niže razine tih metala. Ovi rezultati ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se bolje razumjele razlike između samoniklih i kultiviranih gljiva.

Ključne riječi: teški metali, minerali, samonikle jestive gljive, ICP-MS, toksikologija gljiva

9. SUMMARY

Analysis of heavy metals and mineral composition of edible mushrooms using ICP-MS technique

Objective: The aim of this study was to analyze the accumulation of heavy metals in samples of wild edible mushrooms from various locations in Croatia, as well as in cultivated mushroom species, and to analyze their mineral profiles. Eleven elements were examined, including heavy metals such as lead (Pb), cadmium (Cd), mercury (Hg), arsenic (As), chromium (Cr), and aluminum (Al). The research aimed to identify differences in the composition of mushrooms based on their geographical and botanical origins, to study the impact of origin on the content of trace elements, and to assess the safety of edible mushrooms in accordance with Croatian and European Union regulations.

Methods: The study analyzed 39 samples of edible mushrooms, including 34 wild samples and 5 cultivated samples. Samples were collected from April to November 2023 from various locations across Croatia. Sample collection was organized in collaboration with volunteers, mushroom foragers, and collectors, who ensured representative samples from all parts of the country. Special attention was given to selecting mushrooms with different geographical and ecological characteristics to capture possible variations in metal accumulation. All samples were analyzed at the Teaching Institute for Public Health "Dr. Andrija Štampar" in Zagreb, at the Department of Food Safety and Quality. Advanced multielemental inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used, which allows precise measurement of the concentrations of 11 elements, including heavy metals such as lead, cadmium, mercury, arsenic, chromium, and aluminum. Prior to analysis, mushroom samples underwent microwave digestion, involving wet digestion in the presence of acids to ensure complete release and extraction of the elements. This step is crucial for the accuracy and reliability of the results as it facilitates the breakdown of organic materials and the release of bound metals. After preparation, samples were analyzed using ICP-MS, which allowed detection and quantification of elements at very low concentrations.

Results: The analysis revealed significant variations in heavy metal concentrations among samples. The research findings showed notable differences in heavy metal concentrations in the analyzed mushroom samples. In two mushroom species, *Craterellus cornucopioides* and

Macrolepiota procera, lead concentrations were measured above the permitted limit of 0.8 mg/kg, with the highest value being 1.44 mg/kg in mushrooms from Primorje-Gorski Kotar County. Cadmium was found in concentrations exceeding the allowed 0.5 mg/kg, with the highest value reaching 2.37 mg/kg in mushrooms from Varaždin County. Aluminum was recorded at a high concentration of 1202.54 mg/kg in *Craterellus cornucopioides* samples, suggesting a risk of excessive intake of this metal. Iron was also found in high concentrations, with a maximum value of 3767.7 mg/kg also in mushroom *Craterellus cornucopioides*. The highest mercury concentration, 13.05 mg/kg, was recorded in *Boletus edulis* sample from Donja Stubica, significantly exceeding the allowable weekly intake. Cultivated mushrooms showed lower heavy metal concentrations compared to wild ones, confirming their safety for consumption. However, wild mushrooms had higher selenium concentrations (99.79 mg/kg), while cultivated mushrooms exhibited higher zinc concentrations (46 mg/kg).

Conclusion: The study demonstrated that wild mushrooms accumulate heavy metals, with geographical and botanical origins significantly affecting their content. Elevated levels of lead, cadmium, aluminum, and mercury were found in certain regions of Croatia, which may pose health risks to consumers. In contrast, mushrooms from controlled cultivation have lower levels of these metals. These results highlight the need for further research to better understand the differences between wild and cultivated mushrooms.

Key words: heavy metals, minerals, wild edible mushrooms, ICP-MS, mushroom toxicology

10. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime i prezime: Lucija Jagatić

Datum i mjesto rođenja: 12.06.1991. u Zagrebu

Adresa: Lovćenska 69, 10 000 Zagreb

E-mail: lucija.jagatic91@gmail.com

Obrazovanje:

2005. - 2009. V. GIMNAZIJA U ZAGREBU - Maturant gimnazije

2009. - 2012. PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET U ZAGREBU

2013. - 2016. ZDRAVSTVENO VELEUČILIŠTE U ZAGREBU

Stručni prvostupnik medicinsko - laboratorijske dijagnostike

2020. FITNES UČILIŠTE U ZAGREBU

Instruktor pilatesa

2022. - 2024. SVEUČILIŠNI STUDIJ FORENZIČNIH ZNANOSTI U SPLITU

Praktično iskustvo:

Stručnu laboratorijsku praksu odradila sam u medicinsko - biokemijskom laboratoriju Klinike za traumatologiju „KBC-a Sestre milosrdnice” u Zagrebu, godinu dana iskustva stekla sam u Odjelu za eritrocitnu dijagnostiku „Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu” u Zagrebu i četiri godine radnog iskustva u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i genetiku u „KB Dubrava” u Zagrebu. Trenutno radim na Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije u KB Dubrava, u Zagrebu.

Ostale vještine:

Jezici: hrvatski (materinji), engleski

Digitalne vještine: Microsoft Windows, MS Office

Vozačka dozvola: Da

Osnovna glazbena škola: Glazbeno učilište ”Elly Bašić” u Zagrebu (klavir)

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Lucija Jagatić, izjavljujem da je moj diplomski rad pod nazivom

“Analiza teških metala i mineralnog sastava jestivih gljiva ICP-MS tehnikom”

rezultat mog vlastitog istraživanja i rada. Rad se temelji na mojim vlastitim istraživanjima i oslanja na izvore koji su navedeni u popisu literature. Svi korišteni izvori i literatura su pravilno navedeni, a rad je izrađen u skladu s etičkim načelima akademske čestitosti te ne krši tuđa autorska prava.

Potvrđujem da nisam koristila neovlaštene izvore i da je sav sadržaj rada originalan te da nije korišten u drugim radovima u drugoj obrazovnoj ili znanstvenoj ustanovi.

U Splitu,

Potpis studenta/studentice:

