



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Maja Maslač Mikulec

**UČINAK ONEČIŠĆENJA ZRAKA IZ
RAFINERIJE NAFTE NA FIZIOLOŠKE
PROMJENE U LIŠAJEVIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Mirta Tkalec i prof. dr. sc. Oleg Antičić

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Science

Department of Biology

Maja Maslač Mikulec

THE EFFECT OF AIR POLLUTION FROM AN OIL REFINERY ON LICHEN PHYSIOLOGICAL CHANGES

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

Prof. Mirta Tkalec, PhD and Prof. Oleg Antonić, PhD

Zagreb, 2025

Ovaj je doktorski rad izrađen na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirte Tkalec i prof. dr. sc. Olega Antonića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ova disertacija je većim dijelom izrađena uz financijsku podršku projekta „Lišajevi kao bioindikatori zagađenja u okolišu (OkoLIŠ)“; šifra projekta: HR.3.2.01 – 0130. Projekt je sufinancirala EU iz Europskog socijalnog fonda (ESF).

Zahvale

Na početku želim izraziti svoju duboku zahvalnost svojim mentorima, Mirti i Olegu, za neiscrpnu podršku, strpljenje, toplinu i stručnost tijekom izrade ove disertacije. Posebno cijenim i prijateljstva koja smo izgradili putem. Također, zahvaljujem svim članovima komisije na konstruktivnim komentarima na disertaciju.

Zahvaljujem Marku Miliši i Svenu Jelaski, koji su mi povjerili ulogu naslovnog asistenta kroz tri godine, što mi je omogućilo studiranje bez financijskog opterećenja. Iskreno zahvaljujem kolegicama s Hrvatskog veterinarskog instituta, Mariji Sedak i Nini Bilandžić, te s Agronomskog fakulteta, Aleksandri Perčin i Željki Zgorelec, za ugodnu suradnju. Posebna zahvala ide mojim kolegama lihenolozima iz različitih zemalja – Anamariji Partl, Helmutu Mayrhoferu, Luci Paoli, Tobyju Spribilleu, Yngvaru Gauslaau, Silvani Munzi i Pauli Matos – za njihovu potporu u stručnom razvoju, kao i uvijek spremnost na savjete, posjete i zajednički rad.

Velika hvala prijatelju i izvanrednom biologu Marku Dobošu, čiji su entuzijizam, spretnost, energija i poznavanje lokacija na Požeškoj gori bitno doprinijeli uspjehu ovog istraživanja. Hvala Vesni Andrić na vrijednim lokalnim informacijama i gostoprimstvu u Slavonskom Brodu. Posebno zahvaljujem prijatelju i odličnom geofizičaru Goranu Gašparcu, za spremnost da se upusti sa mnom u holistički pristup istraživanju kvalitete zraka. Hvala Luki Antoniću na pomoći u preuzimanju beskrajnih podataka od DHMZ-a, te Karli Čmelar na vizualizaciji istih. Hvala Toniju Safneru za konstruktivne rasprave o statistici. Posebno veliko hvala ide Juhi Jolkkonenu na rezidenciji za pisanje, potpori u radu s R-om i tijekom procesa pisanja „tri slova“. Također, hvala svim prijateljima koji su bili beskrajna podrška i najbolji navijači, bili mi društvo na terenu i u laboratoriju, preuzimali obveze na sebe kako bih se mogla posvetiti pisanju, te omogućili mi rezidencije za pisanje u svojim domovima: Eleni, Dini, Teni, Pauli, Loreni, Lovorki, Ireni, Svenu, Ivani, Neveni, Anji, Vedranu, Hrvoju, Marini, Jeleni, Valeriji, Bartu, Marku, Ani, Antoniji. Posebne zahvale idu mojim roditeljima, koji su mi uvijek pružali potporu bez ikakvog pritiska – što je zaista blagoslov. Hvala mojoj sestri Ani na stalnoj potpori u životu i nećaku Josipu koji mi donosi posebnu radost. Najveće hvala ide mom mužu Sanu, koji je svojom nepresušnom strpljivošću i razumijevanjem bio uz mene tijekom svih godina rada na ovom doktoratu. Zahvala također ide njegovoj baki, koja je ugostila dio uzoraka u svojoj škrinji, te njegovim roditeljima na podršci. Hvala i široj obitelji, a posebno sestrini Blaženki i bratiću Mariu, za njihov doprinos.

Također, zahvaljujem svim dragim ljudima koje sam susrela na ovom putovanju, a koji su ga učinili lakšim i veselijim, između ostalih - tetama iz referade za njihovu podršku i strpljenje, srdačnim tehničarima s fakulteta u Zagrebu, Lisabonu i Åsu, te pažljivim noćnim portirima na Fallerovom gdje sam čistila uzorke.

I na kraju, hvala Bogu na svemu :)

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

UČINAK ONEČIŠĆENJA ZRAKA IZ RAFINERIJE NAFTE NA FIZIOLOŠKE PROMJENE U LIŠAJEVIMA

MAJA MASLAĆ MIKULEC

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Antropogeno onečišćenje zraka je ozbiljan globalni problem, s posljedicama za biološku raznolikost, ekosustave i ljudsko zdravlje. Slavonski Brod, poznat po najlošijoj kvaliteti zraka u Hrvatskoj zbog blizine rafinerije nafte, odabran je za istraživanje posljedica onečišćenja zraka na lišajeve. Analizirani su pokazatelji vitalnosti, bioakumulacija metala i nemetala te sekundarni metaboliti u nativnim (*Flavoparmelia caperata* i *Parmelia sulcata*) i transplantiranim (*F. caperata* i *Evernia prunastri*) lišajevima. Rezultati su potvrdili učinkovitost lišajeva kao bioindikatora i biomonitora. Zabilježena je zabrinjavajuće loša kvaliteta zraka, posebno u blizini rafinerije gdje su pronađene visoke koncentracije teških metala poput nikla i vanadija koje su dovele do "lišajne pustinje". Regresijskom analizom potvrđena je važnost i drugih okolišnih utjecaja na vitalnost i bioakumulaciju (frekvencija i brzina vjetra, orijentacija lišaja na stablu, gustoća vegetacije) osim udaljenosti od rafinerije. To upućuje na kompleksnost prostorne distribucije imisija oko izvora onečišćenja, dodatno naglašavajući iznimno velik okolišni problem s kvalitetom zraka u Slavonskom Brodu koji zahtijeva hitno rješavanje.

(130 stranica / 41 slika / 13 tablica / 110 literaturnih navoda / jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: biomonitoring, bioindikatori, generalizirani linearni model (GLM), vitalnost lišajeva, bioakumulacija, sekundarni metaboliti, teški metali

Mentori: prof. dr. sc. Mirta Tkalec i prof. dr. sc. Oleg Antonić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Sven Jelaska

prof. dr. sc. Siniša Ozimec

izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

THE EFFECT OF AIR POLLUTION FROM AN OIL REFINERY ON LICHEN PHYSIOLOGICAL CHANGES

MAJA MASLAĆ MIKULEC

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Anthropogenic air pollution is a serious global problem, with consequences for biodiversity, ecosystems, and human health. Slavonski Brod, known for having the worst air quality in Croatia due to its proximity to an oil refinery, was chosen to investigate the effects of air pollution on lichens. Lichen vitality, metal and non-metal bioaccumulation, and secondary metabolites were analysed in native (*Flavoparmelia caperata* and *Parmelia sulcata*) and transplanted (*F. caperata* and *Evernia prunastri*) lichens. The results confirmed the effectiveness of lichens as bioindicators and biomonitors. Air quality was a concern, especially near the refinery, where high concentrations of heavy metals such as nickel and vanadium were found, leading to a "lichen desert". The regression analysis confirmed other influences on lichen vitality and bioaccumulation (frequency and wind speed, orientation of lichens on trees, vegetation density) besides distance from the refinery. This indicates the complexity of the spatial distribution of immissions around the pollution source, additionally emphasizing a serious environmental problem with air quality in Slavonski Brod that requires urgent resolution.

(130 pages / 41 figures / 13 tables / 110 references / original in: Croatian)

Keywords: biomonitoring, bioindicators, generalized linear model (GLM), lichen vitality, bioaccumulation, secondary metabolites, heavy metals

Supervisors: Prof. Mirta Tkalec, PhD and Prof. Oleg Antičić, PhD

Reviewers: Prof. Sven Jelaska, PhD

Prof. Siniša Ozimec, PhD

Assoc. Prof.. Sunčica Bosak, PhD

ŽIVOTOPISI MENTORA

Prof. dr. sc. Mirta Tkalec završila je 1996. godine studij biologije, smjer molekularna biologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Od 1998. zaposlena je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a. Magistarski rad obranila je 2002., a doktorirala 2005. u području prirodnih znanosti, polje biologija. U znanstveno-nastavno zvanje docentice izabrana je 2009., u zvanje izvanredne profesorice 2014. a od 2020. je redovita profesorica na istoj ustanovi. Nositeljica je obaveznog kolegija „Fiziologija bilja“ i sunositeljica izbornih kolegija „Metabolizam biljaka u stresnim uvjetima“, „Regulacijski mehanizmi u fotosintezi“, „Fiziologija stresa i obrambeni mehanizmi biljaka“ i „Pokusi iz fiziologije bilja u nastavi“ na prijediplomskom i diplomskom studiju, dok je na doktorskom studiju sunositeljica kolegija „Interakcije biljaka i okoliša“. Bila je voditeljica jedne doktorske disertacije te 38 diplomskih i završnih radova. Ko-autorica je dva sveučilišna priručnika. Područje njenog znanstvenog interesa je fiziologija stresa u biljaka, gdje se bavi istraživanjem učinaka abiotičkih i biotičkih stresnih čimbenika na fiziološke promjene u biljaka s naglaskom na analizu procesa uključenih u fotosintezu, biokemijske analize različitih biljnih metabolita te kromatografske analize pigmenata i sekundarnih metabolita. Znanstveno se usavršavala u Sloveniji. Bila je voditeljica dva projekta financiranih iz Europskih fondova te je aktivno sudjelovala na 6 znanstvenih projekata financiranih od HRZZ i MZOS te 1 međunarodnom. Objavila je 58 znanstvenih radova, tri poglavlja u knjigama, a na domaćim i inozemnim znanstvenim skupovima sudjelovala je s 97 znanstvenih priloga. Recenzirala je više od 30 znanstvenih radova za različite međunarodne znanstvene časopise. Ko-urednica je časopisa *Acta Botanica Croatica* te članica nekoliko strukovnih udruga. Sudjelovala je u organizaciji i provedbi nekoliko manifestacija za popularizaciju znanosti gdje je održala brojna javna predavanja i radionice.

Prof. dr. sc. Oleg AntoniĆ je 1991. diplomirao šumarstvo (Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu), 1993. magistrirao Biomatematiku (izvoditelji više hrvatskih fakulteta i instituta), a 1996. doktorirao na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (u znanstvenom području prirodnih znanosti, polje biologija, grana ekologija). Nakon dvadeset godina zaposlenja na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu (do 2007. kao znanstveni suradnik, do 2012. kao viši znanstveni suradnik), zaposlen je na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku (do 2017. kao izvanredni profesor, do 2023. kao redoviti profesor, a potom kao redoviti profesor u trajnom zvanju), gdje je na preddiplomskom studiju nositelj kolegija „Geobotanika“, na diplomskim studijima nositelj kolegija „Terestrička ekologija“, „Geoinformatika u zaštiti prirode i okoliša“, „Okolišni i prirodni resursi“, te „Procjena utjecaja na prirodu i okoliš“, dok na interdisciplinarnom doktorskom studiju „Zaštita prirode i okoliša“ vodi kolegije „Ekologija“, „Geoinformatika i daljinska istraživanja“ i „Ekologija šuma“. Bio je voditelj ili suvoditelj ukupno 17 kvalifikacijskih radova od čega 8 doktorskih disertacija, 3 magistarska rada, 5 diplomskih radova i 1 završnog rada. Područja njegovog znanstvenog djelovanja obuhvaćaju ekološko modeliranje u terestričkim (posebno šumskim) ekosustavima, monitoring stanja ekosustava, geomorfometriju, bioklimatologiju, pedologiju, raster-GIS modeliranje i multivarijatnu statistiku. Objavio je 47 znanstvenih radova i jedno poglavlje u međunarodnom udžbeniku, a suautor je na jednom sveučilišnom udžbeniku. Recenzirao je desetke znanstvenih radova za različite međunarodne znanstvene časopise i sudjelovao sa znanstvenim priložima na brojnim znanstvenim skupovima. Član je nekoliko znanstvenih i stručnih udruga. Bio je član izdavačkog savjeta znanstvenog časopisa Hrvatske vode. Sudjelovao je na brojnim istraživačkim projektima u području zaštite prirode, procjene utjecaja na okoliš i inventarizacije prirodnih resursa.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Cilj i hipoteze istraživanja	4
2.	LITERATURNI PREGLED	5
2.1.	Onečišćenje zraka	5
2.1.1.	Onečišćujuće tvari.....	6
2.2.	Lišajevi kao bioindikatori i biomonitori kvalitete zraka.....	10
2.2.1.	Vitalnost lišajeva.....	11
2.2.2.	Bioakumulacija različitih elemenata u lišajevima	13
2.2.3.	Sekundarni metaboliti lišajeva	14
2.2.4.	Istraživanje nativnih i transplantiranih lišajeva	15
2.2.5.	Analize ekoloških čimbenika u biomonitoringu	16
2.2.6.	Pregled recentnih istraživanja lišajeva	16
3.	MATERIJALI I METODE	18
3.1.	Područje istraživanja.....	18
3.1.1.	Onečišćenje zraka u Slavonskom Brodu.....	18
3.1.2.	Podaci o vjetru za Slavonski Brod	25
3.1.3.	Rafinerija nafte u Bosanskom Brodu	27
3.2.	Eksperimentalni dizajn	28
3.2.1.	Terenska istraživanja lišajeva	30
3.2.2.	Laboratorijske analize	34
3.3.	Numerička obrada podataka	39
3.3.1.	Osnovna statistička obrada podataka	39
3.3.2.	Izrada regresijskih modela	40
3.3.3.	Ocjena bioakumulacije metala s kartama distribucije elemenata	41
4.	REZULTATI.....	43
4.1.	Nativni lišajevi.....	43
4.1.1.	Vitalnost nativnih lišajeva.....	44
4.1.2.	Bioakumulacija elemenata u nativnim lišajevima	46

4.1.3.	Sekundarni metaboliti u nativnim lišajevima	47
4.1.4.	Karte distribucije bioakumuliranih elemenata u nativnim lišajevima.....	48
4.1.5.	Usporedba rezultata između ploha za native lišajeve	50
4.1.6.	Univarijatna korelacija zavisnih varijabli za native lišajeve.....	52
4.1.7.	Regresijski modeli za native lišajeve	53
4.2.	Transplantirani lišajevi	56
4.2.1.	Vitalnost transplantiranih lišajeva.....	57
4.2.2.	Bioakumulacija elemenata u transplantiranim lišajevima	62
4.2.3.	Sekundarni metaboliti u transplantiranim lišajevima.....	70
4.2.4.	Karte distribucije bioakumuliranih elemenata u transplantiranim lišajevima.....	73
4.2.5.	Usporedba ploha prema uzorcima transplantiranih lišajeva	78
4.2.6.	Univarijatna korelacija zavisnih varijabli za transplantirane lišajeve.....	83
4.2.7.	Regresijski modeli za transplantirane lišajeve	86
4.3.	Usporedba bioakumulacije nativnih i transplantiranih lišajeva	88
5.	RASPRAVA	89
5.1.	Nativni lišajevi.....	89
5.2.	Transplantirani lišajevi	94
5.3.	Usporedba nativnih i transplantiranih lišajeva	98
5.4.	Prostorna i okolišna varijabilnost	100
5.4.1.	Nativni lišajevi.....	100
5.4.2.	Transplantirani lišajevi	101
5.5.	Metodološka ograničenja i preporuke za buduća istraživanja	103
6.	ZAKLJUČAK	105
7.	POPIS LITERATURE	107
8.	PRILOZI	119
9.	ŽIVOTOPIS.....	129

1. UVOD

Problem onečišćenja zraka postaje sve značajniji na globalnoj razini, utječući na biološku raznolikost, ekologiju i ljudsko zdravlje, ali i na klimatske promjene i ekonomiju (Manisalidis i sur., 2020). Kako bi se kvalitetno istraživala i pratila kvaliteta zraka na određenom području, sve se češće kao bioindikatori i biomonitori koriste živi organizmi (Forbes i sur., 2015). Ova metoda ima značajne prednosti nad tradicionalnim mjerenjima koncentracija onečišćujućih tvari, jer organizmi odražavaju biološki relevantan stupanj onečišćenja zraka, reagirajući na složene utjecaje različitih onečišćujućih tvari i mikroklimatskih uvjeta kroz vrijeme. Osim toga, omogućuju uvid u integrirani profil onečišćenja kroz dulja vremenska razdoblja, uključujući sezonske i godišnje varijacije, te pružaju veću prostornu rezoluciju u usporedbi sa standardnim mjernim metodama (Brunialti i Frati, 2007). Mahovine i lišajevi su se pokazali izuzetno prikladnima za ove svrhe jer primarno upijaju hranjive tvari iz oborina i suhim taloženjem lebdećih čestica, pri čemu je unos čestica iz podloge zanemariv zbog nedostatka korijenja i vrlo tanke ili nepostojeće kutikule (Smodiš i Parr, 1999).

Lišajevi su samoodržive zajednice mikobionta (gljiva) i fotobionta (algi ili cijanobakterija), a koriste se kao bioindikatori i biomonitori kvalitete zraka. Kao bioindikatori, lišajevi nas mogu informirati o prisutnosti onečišćenja zraka, pri čemu se najčešće analizira promjena u sastavu zajednice lišajeva ili njihova vitalnost. Ocjenjivanje stanja lišajeva (tj. vitalnosti) na određenom geografskom području uključuje analizu morfoloških i fizioloških promjena (Paoli i sur., 2020). Fotobionti su posebno osjetljivi na onečišćenje, stoga se vitalnost lišajeva često procjenjuje kao promjena u učinkovitosti fotosinteze i sadržaju fotosintetskih pigmenata. Učinkovitost fotosinteze najčešće se određuje mjerenjem fluorescencijskog parametra F_v/F_m , koji pouzdano pokazuje maksimalnu fotokemijsku kvantnu učinkovitost fotosustava II i nije osjetljiv na temperaturu (Shukla i sur., 2014). Brojne studije pokazuju da se ovaj parametar smanjuje pod stresnim uvjetima, poput onečišćenja zraka (Gauslaa i sur., 2021; Kummerová i sur., 2006; Munzi i sur., 2012; Paoli i sur., 2015b). Također, omjer fotosintetskih pigmenata mijenja se s kvalitetom zraka, pri čemu opada koncentracija klorofila *a*, dok raste koncentracija feofitina (Gauslaa i sur., 2021; González i sur., 1996; Kumari i sur., 2024; Lackovićová i sur., 2013; Paoli i sur., 2015d).

S druge strane, biomonitoring omogućuje kvantitativno praćenje razine onečišćenja zraka. Brojne studije potvrđuju da su lišajevi izvrsni biomonitori kvalitete zraka jer akumuliraju teške

metale, čija koncentracija u njihovom talusu izravno odražava koncentracije u neposrednoj okolini (Aprile i sur., 2010; Conti i sur., 2009; Kularatne i de Freitas, 2013). Istraživanja su također pokazala da lišajevi mogu odražavati prisutnost nemetala poput sumpora (Oztetik i Cicek, 2011) te danas učestalijeg onečišćivača zraka, dušika (Boltersdorf i Werner, 2013). Iako su ovi spojevi nužni za život organizama, visoka razina atmosferskog taloženja sumpora i dušikovih spojeva negativno utječe na organizme, uključujući lišaje. Osim što izravno djeluju kao onečišćujuća tvar, oni također uzrokuju zakiseljavanje, što može povećati mobilizaciju toksičnih metala, dok dušikovi spojevi dodatno pridonose eutrofikaciji (European Environment Agency, 2024a).

Bioindikatori i biomonitori mogu biti pasivni (nativni lišajevi) ili aktivni (transplantirani lišajevi). Nativni lišajevi prirodno rastu na području istraživanja, dok se transplantati unose iz regija s čistim zrakom kako bi se promatrale promjene nakon određenog vremena izloženosti. Transplantirani lišajevi posebno su korisni u područjima s visokim razinama onečišćenja, gdje nema dovoljno prikladnih autohtonih lišajeva za uzorkovanje (Conti i Cecchetti, 2001).

Mješavine onečišćujućih tvari iz urbanih i industrijskih izvora mogu u ekosustavima imati sinergijske, aditivne ili antagonističke učinke na lišajeve. Pojedine vrste lišajeva razlikuju se po osjetljivosti na onečišćenja i reagiraju različito na te mješavine (Shukla i sur., 2014). Stoga, sveobuhvatna analiza kvalitete zraka na određenom području treba uključivati više metodologija, kao što su istraživanje fizioloških reakcija, uključujući sadržaj fotosintetskih pigmenata i efikasnost fotosintetskog aparata, te analize elemenata u talusu, kako bi se otkrila izloženost, prijetnje i utjecaji izvora onečišćenja. U proteklih 40 godina provedene su brojne studije u kojima su korišteni različiti pristupi pri korištenju lišajeva za određivanje kvalitete zraka. To naglašava potrebu za studijama koje obuhvaćaju više pristupa, različite vrste lišajeva, te više vremenskih i prostornih točaka, gdje bi se različite metodologije mogle međusobno vrednovati u okviru jedinstvenog istraživanja. Također, s obzirom na složenost okolišnih čimbenika koji mogu utjecati na fiziološki odgovor lišajeva, rezultati ovakvih istraživanja trebaju se tumačiti pomoću odgovarajućeg statističkog modela. Opći linearni modeli već su korišteni za analizu ekoloških čimbenika u biomonitoringu, ali uglavnom u metodologiji koja koristi bioraznolikost lišajeva kao pokazatelj onečišćenja zraka (Cristofolini i sur., 2008; Dymytrova i sur., 2016). Jedan od dokazanih čimbenika koji utječu na dostupnost onečišćujućih tvari u zraku je strujanje zraka iz onečišćenih područja. Većina istraživanja u biomonitoringu često samo kvalitativno komentira ružu vjetrova na analiziranom području, bez korištenja kvantitativnih vrijednosti (npr. Stamenković i sur., 2013). Međutim, budući da su postojeća

istraživanja koja koriste standardna mjerenja koncentracije onečišćujućih tvari pokazala da su smjer i brzina vjetra ključni prediktori prostorne razdiobe onečišćenja zraka (Kim i sur., 2015), ovi parametri trebali bi biti uključeni kao nezavisni procjenitelji u statističke modele za objašnjenje prostorne razdiobe lišajeva i njihovog fiziološkog stanja. Uvjeti koji utječu na mikroklimu, a time i na vitalnost lišajeva, često su zanemareni u istraživanjima (npr. orijentacija lišajeva na stablu ili gustoća vegetacije) te se dosad nisu uključivali kao nezavisni procjenitelji u statističke modele. U Hrvatskoj, rafinerije nafte predstavljaju najveći izvor onečišćenja zraka, te je njihovo okruženje prikladno područje za sveobuhvatno istraživanje kvalitete zraka putem lišajeva.

Iz istraživanja provedenog u sklopu ove disertaciju objavljen je za sada jedan rad, pod nazivom „Any Way the Wind Blows Does Really Matter in Lichen Response to Air Pollution from an Oil Refinery“ (Maslač Mikulec i sur., 2025). Ovaj rad sadrži rezultate dijela istraživanja na nativnim lišajevima, gdje su uz pokazatelje vitalnosti nativnih lišajeva, bioakumulaciju metala i nemetala, istovremeno analizirani okolišni čimbenici koji utječu na kvalitetu zraka i na lišajeve na području Slavenskog Broda. Osobito značajnim pokazali su se parametri vezani uz vjetar, uključujući brzinu, učestalost i smjer.

1.1. Cilj i hipoteze istraživanja

Istraživanje lišajeva u blizini snažnog izvora onečišćenja zraka objedinit će dva pristupa uzorkovanja (nativne i transplantirane uzorke) te praćenje različitih indikatora fizioloških promjena i akumulacije metala i nemetala u lišajevima izazvanih onečišćenjem zraka. Ovaj će pristup omogućiti bolje teorijsko razumijevanje izazova praćenja onečišćenja te dati konkretne preporuke za praktičnu primjenu u praćenju kvalitete zraka. Također, bit će utvrđen i kvantificiran učinak onečišćenja zraka na fiziološko stanje nativnih i transplantiranih lišajeva, uzrokovan emisijama štetnih tvari iz rafinerije nafte. Osim toga, istražiti će se koliko utjecaj udaljenosti izvora onečišćenja zraka na fiziološki odgovor i akumulaciju metala i nemetala lišajeva ovisi o drugim okolišnim čimbenicima.

Cilj ovog istraživanja je objasniti fiziološke promjene te akumulaciju metala i nemetala u lišajevima onečišćenjem zraka iz rafinerije nafte, uzimajući u obzir druge okolišne faktore, uz korištenje različitih metoda kako bi se usporedbom dobivenih rezultata steklo bolje teorijsko razumijevanje problematike i dizajnirao optimalni sustav biomonitoringa kvalitete zraka.

Kroz istraživanje ćemo istražiti sljedeće hipoteze:

1. Fiziološki odgovor nativnih i transplantiranih uzoraka lišajeva ukazat će na smanjenu kvalitetu zraka u okolini Slavenskog Broda.
2. Lišajevi bliže rafineriji bit će pod jačim učinkom onečišćenja zraka: imat će niže vrijednosti za pokazatelje vitalnosti, te više koncentracije sekundarnih metabolita i akumuliranih onečišćujućih tvari.
3. Bioakumulacija onečišćujućih tvari bit će najveća u nativnim uzorcima, dok će u transplantatima biti to veća, što je veće vrijeme izlaganja.
4. Promjena učinkovitosti fotosintetskog aparata pokazat će se najosjetljivijom metodom za određivanje oštećenja lišajeva onečišćenjem zraka.
5. Okolišni čimbenici (smjer i brzina vjetra, gustoća vegetacije, orijentacija lišajeva na stablu) značajno će utjecati na zavisnost stupnja oštećenja od udaljenosti do rafinerije.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Onečišćenje zraka*

Onečišćenje zraka predstavlja jedan od najvećih problema našeg vremena, i unatoč značajnim naporima da se smanji, njegova važnost u svijetu kontinuirano raste. Dokumentirani su brojni negativni utjecaji na biološku raznolikost, funkcioniranje ekosustava i ljudsko zdravlje, ali i klimatske promjene i ekonomiju (Manisalidis i sur., 2020). Sve se više prepoznaje i socijalni utjecaj smanjene kvalitete zraka (European Environment Agency, 2024a). Svi su ovi utjecaji međusobno povezani, te ih je potrebno sagledati u cjelini kako bi se razumjeli te ublažile posljedice:

- **ljudsko zdravlje:** onečišćenje zraka povezano je s nizom ozbiljnih zdravstvenih problema, uključujući bolesti dišnog sustava poput astme, kronične opstruktivne plućne bolesti i raka pluća. Također, može doprinijeti razvoju kardiovaskularnih bolesti. Osobito su ugrožene ranjive skupine, poput djece, starijih osoba i onih s postojećim lošim zdravstvenim stanjima. Čak 99 % svjetske populacije u 2019. godine je živjelo na mjestima gdje razine kvalitete zraka prema smjernicama WHO-a nisu bile zadovoljene, a procjenjuje se da je ambijentalno (vanjsko) onečišćenje zraka uzrokovalo 4,2 milijuna preuranjenih smrti širom svijeta te godine (WHO, 2021).
- **socijalni utjecaj:** onečišćenje zraka često najviše pogađa ranjive skupine, uključujući djecu, starije osobe i zajednice s nižim prihodima koje žive u blizini izvora onečišćenja poput industrijskih postrojenja, što doprinosi socijalnoj i ekonomskoj nejednakosti (European Environment Agency, 2024a).
- **funkcioniranje ekosustava:** onečišćujuće tvari poput sumporovog dioksida i dušikovih oksida mogu uzrokovati kiselu kišu, koja šteti ekosustavima zakiseljavanjem tla i vodnih tijela. Također, dušikovi spojevi dovode do eutrofikacije ekosustava.
- **bioraznolikost:** onečišćenje zraka utječe na divlju floru i faunu direktno (npr. akumulacija teških metala) i indirektno (npr. onečišćujući njihova staništa), što može dovesti do zdravstvenih problema i poremećaja u reproduktivnim ciklusima.
- **klimatske promjene:** određene onečišćujuće tvari, poput ugljikova dioksida i metana, staklenički su plinovi koji zadržavaju toplinu u atmosferi, doprinoseći globalnom zatopljenju i klimatskim promjenama.

- **ekonomski troškovi:** kumulativni utjecaj zdravstvenih problema, degradacije okoliša i klimatskih promjena zbog onečišćenja zraka može dovesti do značajnih ekonomskih troškova.

Napori za smanjenje onečišćenja zraka uključuju prelazak na čišće izvore energije, poboljšanje tehnologija za kontrolu emisija, promociju održivog prijevoza i provedbu politika koje potiču zaštitu okoliša (European Environment Agency, 2024b).

2.1.1. Onečišćujuće tvari

Kako bismo razumjeli onečišćenje zraka, moramo razumjeti onečišćujuće tvari te potencijalne izvore onečišćenja. Emisija predstavlja oslobađanje onečišćujućih tvari u obliku plinova ili krutina iz određenih izvora u okoliš. Izvori onečišćenja zraka mogu biti prirodni, poput erupcija vulkana, seizmičkih aktivnosti, geotermalnih događaja, požara na teško dostupnim područjima, snažnih vjetrova, ili atmosferskog podizanja i prijenosa prirodnih čestica iz sušnih područja. Uz prirodne, tu su i antropogeni izvori, koje dijelimo na nepokretne (točkasti i difuzni) i pokretne izvore emisije (DLS, 2018). Glavni antropogeni veliki izvori onečišćenja zraka su elektrane, rafinerije i petrokemijska postrojenja, kemijske i industrije gnojiva, metalurški i drugi industrijski pogoni te, na kraju, komunalne spalionice (Manisalidis i sur., 2020). Također, ispušni plinovi vozila su glavni izvor dušikovih oksida i ugljičnog monoksida. Poljoprivredne aktivnosti su izvor amonijaka i drugih spojeva korištenih u gnojivima, što može pridonijeti stvaranju sekundarnih čestica (WHO, 2021).

Direktive o kvaliteti ambijentalnog zraka postavljaju standarde kvalitete zraka u Europskoj Uniji za 12 onečišćujućih tvari: sumporov dioksid, dušikov dioksid / dušikovi oksidi, lebdeće čestice (PM₁₀, PM_{2.5}), ozon, benzen, olovo, ugljični monoksid, arsen, kadmij, nikal i benzo(a)piren (European Environment Agency, 2024b). Direktive uzimaju u obzir relevantne standarde, smjernice i programe Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). U hrvatskom zakonodavstvu, granične vrijednosti onečišćenja zraka definirane su kako bi se zaštitilo ljudsko zdravlje i okoliš, propisane su Zakonom o zaštiti zraka (NN 127/19, 57/22 136/24) i Uredbom o razinama onečišćujućih tvari u zraku (NN 77/20) te s mjerodavnim propisima Europske unije. **Granična vrijednost (GV)** je razina onečišćenosti koju treba postići u zadanom razdoblju ispod koje, na temelju znanstvenih spoznaja, ne postoji ili je najmanji mogući rizik od štetnih učinaka na ljudsko zdravlje i/ili okoliš u cjelini i jednom kada je postignuta, ne smije se prekoračiti. S druge strane, **ciljna vrijednost (CV)** je razina onečišćenosti određena radi izbjegavanja, sprječavanja ili umanjivanja štetnih učinaka na ljudsko zdravlje i/ili okoliš u

cjelini koju treba, ako je to moguće, dostići u zadanom razdoblju. Ovisno o onečišćujućoj tvari, te su vrijednosti definirane usrednjavanjem na satnoj, osmosatnoj, dnevnoj ili godišnjoj razini, a za neke je tvari definirano koliko puta godišnje je dopušteno prekoračenje. Na temelju rezultata mjerenja kvaliteta zraka se kategorizira u dvije kategorije, (I) prva kategorija kvalitete zraka označava čist ili neznatno onečišćen zrak u kojem nisu prekoračene granične i ciljne vrijednosti, te (II) druga kategorija kvalitete zraka označava onečišćen zrak u kojemu koncentracije onečišćujućih tvari prekoračuju granične i ciljne vrijednosti.

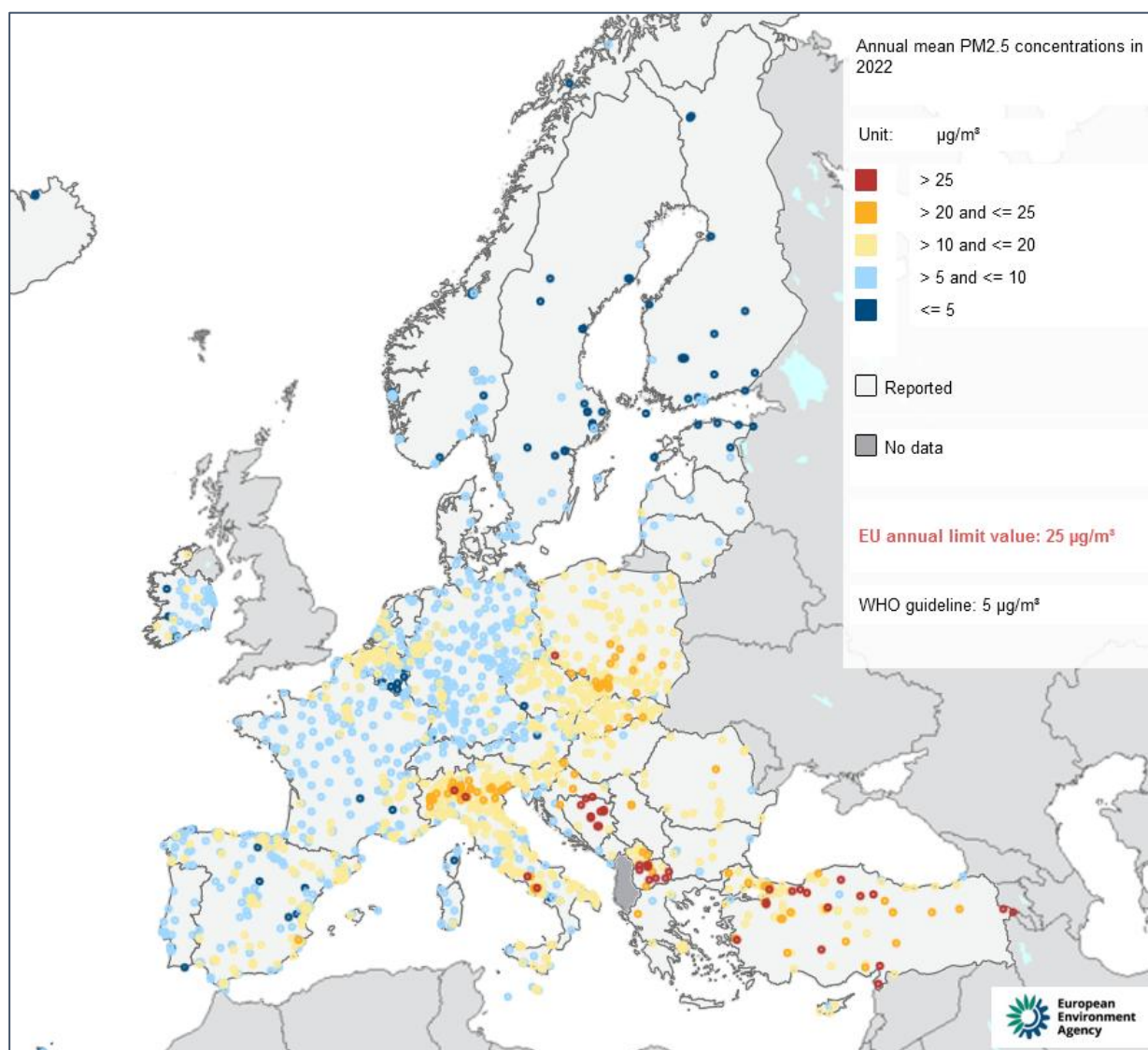
Onečišćujuće tvari se razlikuju po porijeklu (navedene samo one za koje su određene granične i ciljne vrijednosti):

- **PM₁₀** (eng. *particulate matter*) označava lebdeće čestice s promjerom od 10 µm ili manje. PM₁₀ se uglavnom emitira izgaranjem krutih goriva za grijanje domaćinstava, iako su industrijske aktivnosti, poljoprivreda i cestovni promet također važni izvori. Neke čestice dolaze iz prirodnih izvora poput morske soli, saharskog pijeska ili vulkana, a neke (sekundarne PM) nastaju u atmosferi kao kombinacija različitih plinova (na primjer, amonijaka i dušikovog dioksida).
- **PM_{2.5}** označava lebdeće čestice s promjerom od 2,5 µm ili manje. Ove čestice se uglavnom emitiraju izgaranjem krutih goriva za grijanje domaćinstava, industrijskim aktivnostima i cestovnim prometom. Kao i kod PM₁₀, mogu potjecati iz prirodnih izvora te nastati u atmosferi. Poljoprivredne emisije amonijaka značajno doprinose formiranju sitnih čestica u atmosferi.
- Glavni izvor **dušikovog dioksida (NO₂)** je cestovni promet, koji emitira NO₂ blizu tla, uglavnom u gusto naseljenim područjima, pridonoseći izloženosti stanovništva. Drugi važni izvori su procesi izgaranja u industriji i opskrbi energijom.
- **Ozon (O₃)** je spoj koji se stvara u atmosferi kada toplina i svjetlost uzrokuju kemijske reakcije između dušikovih oksida i hlapljivih organskih spojeva (VOC, eng. *volatile organic compounds*), uključujući metan (koji je također snažan staklenički plin). Emisije ovih plinova dolaze iz antropogenih izvora, a u slučaju VOC-a, i iz biogenih izvora. Meteorološke prilike imaju važnu ulogu u formiranju i disperziji onečišćenja zraka te u međugodišnjim varijacijama koncentracija. Ovaj učinak je posebno značajan za ozon.

- **Benzo(a)piren (BaP)** je kancerogena tvar koji se uglavnom emitira izgaranjem ugljena i drva za grijanje te u manjoj mjeri iz industrijskih postrojenja i izgaranjem poljoprivrednog otpada.
- Izvori **sumporovog dioksida (SO₂)** uključuju izgaranje fosilnih goriva u elektranama, industrijske procese poput rafinacije nafte i proizvodnje čelika, izgaranje biomase, prijevoz s dizel gorivom te prirodne izvore poput vulkanske aktivnosti.
- **Ugljični monoksid (CO)** je otrovan plin koji nastaje izgaranjem fosilnih goriva.
- Izvori **hlapljivih organskih spojeva (VOC)** uključuju isparavanje iz naftnih derivata, otapala korištena u industriji i domaćinstvu, ispušne plinove motornih vozila te emisije iz prirodnih izvora poput biljaka.
- **Benzen** je jedan od važnih zagađivača zraka koji potječe iz različitih izvora, uključujući industrijske procese poput rafinacije nafte, izgaranje fosilnih goriva u prometu i korisničku upotrebu u otapalima, bojama i ljepilima.
- **Olovo** se u atmosferu ispušta uglavnom kroz industrijske aktivnosti, kao što su proizvodnja baterija i metalurgija, dok su također značajan izvor povijesni ispušni plinovi iz vozila koja su koristila benzin dodanim tetraetil olovom, kao i stariji materijali poput olovnih cijevi i boja.
- **Arsen** je zagađivač koji se najčešće pojavljuje kao rezultat industrijske proizvodnje metala, gdje se oslobađa tijekom ekstrakcije i rafinacije, a također se nalazi u pesticidima i herbicidima te kao sporedni proizvod iz industrije fosfatnih gnojiva.
- **Kadmij** ulazi u atmosferu kroz ispuštanje iz industrije nikla i cinka, dok se također koristi u proizvodnji baterija i boja, a nastaje i spaljivanjem fosilnih goriva i odlaganjem otpada.
- **Nikal** potječe iz industrijske proizvodnje metala, posebno u procesima taljenja i rudarenja, te se može ispuštati kroz dimnjake industrijskih postrojenja i kao rezultat spaljivanja fosilnih goriva.

U 2022. godini (posljednja godina za koju je napravljen detaljan izvještaj za Europu), unatoč stalnim smanjenjima emisija, veći dio urbane populacije EU-a i dalje je bio izložen razinama ključnih onečišćujućih tvari koji su štetni za zdravlje (European Environment Agency, 2024a). Konkretno, gotovo cijela urbana populacija bila je izložena koncentracijama PM_{2.5} iznad godišnje smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2021) od 5 µg/m³ te koncentracijama ozona (O₃) iznad smjernice za kratkotrajnu izloženost od 100 µg/m³ (European Environment Agency, 2024a). Kao što je vidljivo na karti (Slika 1), Hrvatska se nalazi na mjestu

gdje su ti problemi najizraženiji. Glavnim uzročnicima zdravstvenih problema se smatraju upravo PM_{2.5}, koje mogu prodrijeti duboko u pluća, srce i krvotok, uzrokujući bolesti kao što je rak (Li i sur., 2019). Međutim, i druge onečišćujuće tvari imaju dokazane negativne utjecaje na ljudsko zdravlje.



Slika 1 Validirane koncentracije PM_{2.5} u 2022. godini u odnosu na godišnju graničnu vrijednost Europske Unije i godišnju smjernicu Svjetske Zdravstvene Organizacije (izvor: European Environment Agency, 2024b).

2.2. *Lišajevi kao bioindikatori i biomonitori kvalitete zraka*

Kako bi se istražila i pratila kvaliteta zraka na određenom području, često se koriste živi organizmi kao bioindikatori i biomonitori kvalitete zraka (Forbes i sur., 2015). Iako se ti pojmovi često koriste naizmjenično, u znanstvenom kontekstu, „bioindikatori“ i „biomonitori“ imaju specifične uloge u ocjenjivanju okolišnog stresa. Bioindikatori kvalitativno pokazuju biotičke reakcije, dok biomonitori kvantitativno mjere te reakcije (Holt i Miller, 2011). Dobri biomonitori trebaju biti „osjetljivi“ i/ili „akumulativni“ (Conti i Cecchetti, 2001). Osjetljivi biomonitori, koji uključuju vizualne promjene (morfološke i fiziološke), koriste se kao indikatori stresa uzrokovanog onečišćujućim tvarima te djeluju kao rani sustav za upozoravanje (Abas, 2021). S druge strane, akumulativni biomonitori imaju sposobnost skladištenja onečišćujuće tvari unutar svojih tkiva i koriste se za mjerenje koncentracije tih tvari u okolišu (Abas, 2021). Neki biološki indikatori djeluju isključivo kao osjetljivi ili akumulativni biomonitori, dok postoje i oni koji mogu obavljati obje funkcije, kao što su lišajevi (Nash III, 2008). Lišajevi su samoodrživa zajednica mikobionta (višestanične gljive) i fotobionta (alge ili cijanobakterije), dok se relativno nedavno pokazalo kako su za uspješnu simbiozu bitni i dodatni partneri, odnosno još jedna grupa gljiva, tj. jednostaničnih basidiomiceta (Spribille i sur., 2016). Većina lišajeva ima stratificirani talus građen od gornjeg korteksa, sloja fotobionta, medule i donjeg korteksa (Nash III, 2008). Korištenje organizama u interpretaciji kvalitete zraka ima svojih prednosti nad tradicionalnim mjernim postajama, prvenstveno jer organizmi pokazuju biološki relevantno onečišćenje zraka, odnosno, reagiraju na kompleksne utjecaje i kvalitete zraka i mikroklimatskih uvjeta tijekom određenog vremenskog perioda. Također, pokazuju integrirani profil onečišćenja različitih onečišćujućih tvari kroz određeno vrijeme te ih je moguće postaviti s većom prostornom rezolucijom u odnosu na standardne metode mjerenja (Brunialti i Frati, 2007).

Lišajevi su se, uz mahovine, pokazali kao najprikladniji organizmi za ovakva istraživanja, zbog toga što dobivaju nutrijente izravno od oborina i suhog taloženja lebdećih čestica s gotovo zanemarivim doprinosom čestica iz podloge, što je posljedica nedostatka korijenja, te posjedovanja vrlo tanke kutikule ili njezinog potpunog odsustva (Smodiš i Parr, 1999). Radi ovih svojstava, lišajevi se koriste kao bioindikatori od 1866. godine kada je William Nylander opazio osiromašenje lišajske flore u Luksemburškom parku u Parizu, što je povezao s onečišćenjem zraka (Munzi i sur., 2023). U recentnoj literaturi se navodi kako postoji opsežna literatura o njihovoj upotrebi (Munzi i sur., 2023).

Lišajevi se dakle koriste i kao bioindikatori i kao biomonitori kvalitete zraka. Kao bioindikatori, lišajevi nam mogu dati informaciju postoji li onečišćenje zraka. Pritom se najčešće analizira promjena u zajednici lišajeva ili promjena u vitalnosti lišajeva. Analiza sastava zajednice se obavlja determinacijom vrsta i procjenom brojnosti lišajeva na određenim plohama, prema standardiziranom protokolu (BS EN 16413, 2014). Ova se istraživanja zasnivaju na činjenici da postoje različite razine tolerancije na onečišćenje zraka kod različitih vrsta lišajeva te da se bioraznolikost lišajeva smanjuje s povećanjem onečišćenja zraka, sve do, u slučajevima velikog onečišćenja, tzv. „lišajne pustinje“ (potpuni nestanak lišajeva). Prije nego u potpunosti nestanu, lišajevi ukazuju na prisutnost onečišćenja zraka blijedenjem i promjenom boje talusa zbog smrti stanica fotobionta, što u konačnici dovodi do prekida simbioze i smrti cijelog lišaja (Kumari i sur., 2024). S druge strane, biomonitoring pruža kvantitativne podatke o onečišćenju zraka, što može biti informacija o vitalnosti lišajeva ili bioakumulaciji. Iz svih navedenih razloga lišajevi se koriste za različita istraživanja kvalitete zraka, od urbanih sredina, industrijskih mjesta do čak kvalitete zraka u zatvorenim prostorima (Abas, 2021). Među istraživanjima u okolini industrijskih postrojenja, lišajevi su se koristili za istraživanje i karakterizaciju onečišćenja zraka iz rafinerije nafte, primjerice u Portugalu (Augusto i sur., 2010) i Kanadi (Wadleigh, 2003).

2.2.1. Vitalnost lišajeva

Stanje, odnosno vitalnost, lišajeva obično se na određenom geografskom području ocjenjuje tako da se analiziraju morfološke i fiziološke promjene (Paoli i sur. 2015a). S obzirom na to da su fotobionti posebno osjetljivi na onečišćenje, vitalnost lišajeva se najčešće procjenjuje kroz promjene u učinkovitosti fotosinteze te sadržaju fotosintetskih pigmenata. Učinkovitost fotosinteze se najčešće određuje metodom fluorescencije klorofila *a* i određivanjem maksimalnog kvantnog prinosa fluorescencije kao omjera varijabilne i maksimalne fluorescencije (F_v/F_m) u uvjetima tame. Ovaj parametar je pouzdan pokazatelj maksimalne fotokemijske kvantne učinkovitosti fotosustava II te nije osjetljiv na temperaturu (Shukla i sur., 2014). Omjer F_v/F_m predstavlja efikasnost fotosintetskog aparata u pretvaranju apsorbiranog svjetla u kemijsku energiju. Visok omjer F_v/F_m sugerira da su fotosintetski sustavi zdravi i funkcionalni, dok nizak omjer ukazuje na pad učinkovitosti fotosinteze jer se udio energije koji se iskorištava u fotokemijskim reakcijama smanjuje, a povećava se udio energije oslobođene u obliku topline, odnosno fluorescencije, rezultirajući njihovim porastom (Fracheboud i Leipner, 2003). To se najčešće događa u stresnim uvjetima, kao što su svjetlosni stres, nedostatak nutrijenata ili oštećenje uzrokovano patogenima ili okolišnim uvjetima. Mnoge studije na

lišajevima pokazuju da se ovaj parametar smanjuje uslijed onečišćenja zraka (Gauslaa i sur., 2021; Kummerová i sur., 2006; Maslač i sur., 2016; Munzi i sur., 2012; Paoli i sur., 2015b). Međutim, mogu se koristiti i drugi parametri fluorescencije klorofila, kao što je nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ), fotokemijsko gašenje fluorescencije (q_p) i stopa smanjenja fluorescencije (R_{Fd}) iako su u radovima na lišajevima rjeđe korišteni.

NPQ (eng. *non-photochemical quenching*) je mehanizam zaštite biljaka od prekomjerne sunčeve svjetlosti, koji omogućava rasipanje viška energije kao topline kako bi se smanjio rizik od oštećenja fotosintetskih struktura u kloroplastima. Ovaj proces uključuje promjene u strukturi i funkciji fotosintetskih proteina. S druge strane, q_p (eng. *photochemical quenching*) govori o procesima koji utječu na promjenu učinkovitosti fotosinteze. Do promjene u q_p dolazi zbog zatvaranja reakcijskih centara, što je posljedica zasićenja fotosinteze svjetlom (Maxwell i Johnson 2000).

Parametar R_{Fd} (eng. *fluorescence decrease*) definira se kao omjer smanjenja fluorescencije klorofila (Fd) do postizanja stabilnog stanja u uvjetima kontinuiranog zasićenja svjetlom. R_{Fd} djeluje kao indeks vitalnosti fotosintetskog sustava jer odražava funkcionalnost procesa fotosinteze, koji započinje apsorpcijom svjetlosne energije, a završava fiksacijom ugljikovog dioksida nakon uspostavljanja stabilnog stanja (Lichtenthaler i sur., 2005). Tijekom vegetacijske sezone i razdoblja stresa, R_{Fd} može pružiti informacije o promjenama u fotosintetskoj aktivnosti, ukazujući na to je li potencijalni fotosintetski kapacitet izražen kao F_v/F_m postignut i održan tijekom stabilnog stanja.

Omjer fotosintetskih pigmenata se također mijenja uslijed promjena kvalitete zraka (npr. visoke koncentracije teških metala ili drugih onečišćivača zraka), točnije, smanjuje se koncentracija klorofila *a*, a raste koncentracija feofitina (Gauslaa i sur., 2021; González i sur., 1996; Kumari i sur., 2024; Lackovićová i sur., 2013; Paoli i sur., 2015d).

Feofitin je proizvod razgradnje klorofila. Varijacije u normalnom omjeru klorofila i feofitina (tzv. kvocijent feofitinizacije) koji uobičajeno iznosi 1,4 ukazuju na stres kod lišajeva. Smatra se da je ovaj omjer dobar pokazatelj utjecaja visokih koncentracija SO_2 kod lišajeva kao i učinaka onečišćenja teškim metalima u transplantiranim lišajevima (Conti i Cecchetti, 2001). Svako smanjenje ovog omjera ukazuje na razgradnju klorofila i pojavu stresa za organizam. U istraživanjima se često koristi i ukupna koncentracija klorofila *a+b* (dalje u tekstu kao ukupni klorofil; TChl). Tako lišajevi koji su presađeni u područja s intenzivnim prometom pokazuju povećanje koncentracije klorofila TChl koje je proporcionalno porastu emisija sumporovih i

dušikovih oksida. Također, neki autori navode i omjer klorofila *a/b* kao mjeru za procjenu stresa u lišajevima (Conti i Cecchetti, 2001).

Karotenoidi su pomoćni pigmenti fotosinteze koji pomažu u apsorpciji svjetlosti. Osim toga oni djeluju kao prirodni antioksidansi, štiteći lišajeve od fotooksidativnog oštećenja te osiguravajući integritet membrana. Povećana koncentracija karotenoida zabilježena je u lišajevima koji su pod utjecajem onečišćenja zraka u kojima je zabilježena visoka razina onečišćenja teškim metalima (Bajpai i sur., 2010; Kumari i sur., 2024). Čini se da karotenoidi igraju važnu ulogu u zaštiti lišajeva i njihovih fotobionata od stresa, barem onog uzrokovanog teškim metalima.

2.2.2. Bioakumulacija različitih elemenata u lišajevima

Brojne studije su pokazale da su lišajevi izvrsni za biomonitoring kvalitete zraka jer akumuliraju teške metale, pa koncentracija u njihovom talusu direktno reflektira koncentracije u njihovom okolišu (Aprile i sur., 2010; Conti i Cecchetti, 2001; Conti i sur., 2009; Kularatne i de Freitas, 2013). Također, zabilježeno je da akumuliraju elemente u tragovima iznad svojih fizioloških potreba (Cecconi i sur., 2021). Među nakupljenim elementima u tragovima, neki igraju bitnu ulogu u funkcioniranju stanica, dok drugi djeluju kao toksini. Lišajevi uzimaju elemente ili fizičkim zadržavanjem čestica u međustaničnim prostorima medule, ili nakupljanjem u izvanstaničnom i/ili unutarstaničnom prostoru. Većina vrsta lišajeva može tolerirati visoke koncentracije metala sekvestrirajući ih u staničnoj stijenci ili detoksificirati vezanjem za organske kiseline, sekundarne metabolite, polisaharide i melanin (Kumari i sur., 2024; Rola, 2020). Također zabilježeno je da teški metali utječu na gubitak vode u talusu, pa je tako u laboratorijskim ispitivanjima utvrđen kumulativni učinak olova, bakra i cinka na gubitak vode nakon apsorpcije mješavine metala iz otopine (Conti i Cecchetti, 2001). Određivanjem bioakumulacije teških metala u lišajevima mogu se dobiti važne informacije o vremenskim trendovima, uzajamnim interakcijama metala i mogućem riziku za ljudsko zdravlje, a mogu se koristiti i u dugoročnim programima monitoringa (Brunialti i Frati, 2014).

Također, istraživanja su pokazala da lišajevi mogu odražavati i količine nemetala, kao što su sumpor (Oztetik i Cicek, 2011) ili dušik, koji je danas još i veći problem onečišćenja zraka (Boltersdorf i Werner, 2013). Iako su ovi spojevi nužni za život organizama, visoka razina atmosferskog taloženja sumpora i dušikovih spojeva negativno utječe na organizme, uključujući lišajeve. Osim što izravno djeluju kao onečišćujuća tvar, uzrokuju i zakiseljavanje, što može povećati mobilizaciju toksičnih metala, dok dušikovi spojevi dodatno pridonose

eutrofikaciji (European Environment Agency, 2024a). Visoke razine SO_2 i NO_x mogu uzrokovati smanjenje vrijednosti pH talusa. Primijećeno je da simbionti (alga i gljiva) reagiraju na različite načine na razine pH zbog specifične interakcije povezane s toksičnošću metala. Konkretno, alge su se pokazale kao osjetljivije na kisele kiše (najčešće uzrokovane sumpornim oksidima) u kombinaciji s teškim metalima, do čega često dolazi upravo u blizini industrijskih postrojenja. Toksična koncentracija nikla za algu je bila $7 \mu\text{g/g}$ pri kiselijem pH, a čak 20 mg/g pri smanjenoj kiselosti (Conti i Cecchetti, 2001).

Onečišćenje atmosfere sa SO_2 i NO_x dovelo je do izumiranja osjetljivih vrsta kao što je plućni lišaj, *Lobaria pulmonaria* te vrste *Ramalina farinacea*. Korelacija između depozicije dušika i dušika nakupljenog u lišajevima je pozitivna; međutim, omjer doze i učinka često nema linearnu reakciju, što može uzrokovati probleme u interpretaciji prilikom procjene oštećenja organizama i ekosustava (Conti i Cecchetti, 2001). U svakom slučaju, smatra se da najgora oštećenja lišajnih talusa uzrokuje H_2S , koji je vrlo toksičan plin (Conti i Cecchetti, 2001).

2.2.3. Sekundarni metaboliti lišajeva

Sekundarni metaboliti lišajeva su organske tvari koje nisu izravno potrebne za rast, razvoj i reprodukciju te se nalaze ekstracelularno, a mogu se otopiti u organskim otapalima poput acetona. Ove tvari proizvodi isključivo mikobiont, no njihova proizvodnja ovisi o fotobiontu, odnosno o šećerima koje on stvara. Najveći dio metabolita sintetizira se u acetil-polimalonilnom putu, koji proizvodi posebne skupine spojeva jedinstvene za lišaje, kao što su depsidi, depsidoni, dibenzofurani i usninska kiselina (Elix i Stocker-Wörgötter, 2008). Sekundarni metaboliti mogu se također formirati iz puteva mevalonske ili šikiminske kiseline, kojim nastaju i biljni sekundarni metaboliti. Neki od tih spojeva nalaze se u gornjem korteksu, dok se većina nalazi u meduli, a mogu se nalaziti u značajnim količinama, do otprilike 20 % suhe mase tkiva (Elix i Stocker-Wörgötter, 2008). Ovi spojevi imaju višestruke funkcije u interakciji lišajeva s okolišem, odnosno poznati su antiherbivorni, antimikrobni i larvicidni učinci, te zaštita od visokog UV zračenja i oksidativnog stresa (Elix i Stocker-Wörgötter, 2008). Između ostalog, mogli bi igrati važnu ulogu u homeostazi metala i toleranciji lišajeva na onečišćenje, iako su biokemijski mehanizmi većinom nepoznati (Molnár i Farkas, 2010). U manjem broju istraživanja uspoređivano je onečišćenje uzrokovano teškim metalima i drugim tvarima s koncentracijom sekundarnih metabolita, te su dobiveni raznoliki odgovori (Białońska i Dayan, 2005; Maslać i sur., 2016; Paoli i sur., 2015c; Pawlik-Skowrońska i Bačkor, 2011; Valencia-Islas i sur., 2007).

2.2.4. Istraživanje nativnih i transplantiranih lišajeva

Bioindikatori i biomonitori mogu biti pasivni (nativni lišajevi) ili aktivni (transplantirani lišajevi). Nativni lišajevi prirodno rastu na području istraživanja, dok se transplantati unose iz regija s čistim zrakom kako bi se promatrale promjene nakon određenog vremena izloženosti. Transplantirani lišajevi posebno su korisni u područjima s visokim razinama onečišćenja, gdje nema dovoljno prikladnih nativnih lišajeva za uzorkovanje, odnosno gdje postoji „lišajna pustinja“ (Conti i Cecchetti, 2001).

Italija je jedna od zemalja koja prednjači u istraživanjima kvalitete zraka pomoću lišajeva. Tako autori Brunialti i Frati (2014) donose pregled stanja lihenoloških istraživanja i primjena praćenja kvalitete zraka pomoću bioakumulacije u Italiji tijekom posljednjih 30 godina, pri čemu su obradili 200 radova. Od ukupno 19 vrsta koje su korištene za ovaj tip istraživanja, za native lišajeve su najčešće korištene listaste (foliozne) vrste *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Parmelia sulcata* Taylor i *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., dok su za transplantirane vrste najčešće korištene grmaste (frutikozne) vrste *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf i *Evernia prunastri* (L.) Ach. Općenito, grmaste vrste češće se koriste u transplantatima od listastih, jer osiguravaju veću biomasu po talusu lišaja, kao i lakše čišćenje i postavljanje, čime se istovremeno smanjuje vrijeme obrade i poboljšava homogenost uzoraka. Međutim *F. caperata* se također već uspješno koristila i kao transplantirani bioindikator i biomonitor (npr. Aprile i sur., 2010; Chahloul i sur., 2024; Paoli i sur., 2018a).

Prema Cecconi i sur. (2019), koji su analizirali različite radove koji se bave bioakumulacijom u lišajevima, vrijeme izloženosti transplantanata variralo je između različitih studija od 4 do 12 tjedana s time da je u najviše radova (36 %) izloženost trajala 12 tjedana, u 20-tak % radova je trajala 4 ili 9 tjedana, a u najmanje radova 6 ili 11 tjedana. Generalno, period izloženosti transplantiranih lišajeva može utjecati na vitalnost talusa i posljedično na aktivan proces unosa elemenata. Neki radovi sugeriraju da je optimalan relativno kratki period izloženosti od 1 do 3 mjeseca, budući da presađeni lišajevi mogu izgubiti dio biomase ili postati zasićeni elementima, što značajno mijenja njihovu površinsku strukturu i fiziološke funkcije (Frati i sur., 2005). Međutim, postoje i radovi gdje je vrijeme izlaganja bilo znatno dulje, primjerice 6 ili 10 mjeseci (Baptista i sur., 2008; Yemets i sur., 2014). Osim bioakumulacije, na transplantiranim lišajevima često su paralelno mjerene i promjene u vitalnosti (Paoli i sur., 2018a; Yemets i sur., 2014).

2.2.5. Analize ekoloških čimbenika u biomonitoringu

Mnoga mjerenja onečišćenja zraka na standardnim mjernim postajama pokazala su kako su i smjer i brzina vjetrova važni prediktori prostorne razdiobe onečišćenja zraka (Kim i sur., 2015). Stoga ne čudi da se dominantan smjer vjetrova spominje i u istraživanjima kvalitete zraka pomoću lišajeva. Međutim, većina interpretacija rezultata istraživanja samo kvalitativno komentira ružu vjetrova istraživanog područja bez korištenja kvantitativnih vrijednosti pomoću modela (npr. Bajpai i sur., 2010; Stamenković i sur., 2013) ili detaljnijih analiza. Opći linearni modeli već su korišteni za analizu ekoloških čimbenika u biomonitoringu, ali samo u kontekstu bioraznolikosti lišajeva kao pokazatelja onečišćenja zraka (Cristofolini i sur., 2008; Dymytrova i sur., 2016). Cristofolini i sur. (2008) istražili su potencijalne ekološke prediktore povezane s onečišćenjem zraka i bioraznolikošću lišajeva, ali nisu uključili podatke o vjetru niti analizirali fiziološke promjene lišajeva ili koncentracije elemenata. Osim toga, iako su drugi ekološki prediktori, kao što su podaci o oborinama i topografiji, proučavani u odnosu na distribuciju vrsta lišajeva (npr. Dymytrova i sur., 2016), utjecaj podataka o vjetru ostaje i u ovom istraživanju neistražen. Također, i drugi okolišni uvjeti koji mogu utjecati na mikroklimu i dostupnost onečišćujućih tvari, a samim time i vitalnost lišajeva, često su u istraživanjima zanemareni (npr. orijentacija lišajeva na stablu ili gustoća vegetacije), te se do sada nisu uključivali kao nezavisni procjenitelji u statističke modele, iako se pokazalo kako pozicija lišajeva može utjecati na bioakumulaciju, barem za neke od metala (Marques i sur., 2009).

2.2.6. Pregled recentnih istraživanja lišajeva

Na području Republike Hrvatske relativno malo istraživanja posvećeno je lišajevima, i to pretežno u kontekstu biološke raznolikosti (Mehmedović i sur., 2019). Stoga ne iznenađuje manjak istraživanja kvalitete zraka pomoću lišajeva, uz oslanjanje na skuplje fizikalno-kemijske metode mjerenja onečišćenja. Neka od prethodnih istraživanja obuhvaćaju istraživanja provodljivosti membrana lišajeva kao pokazatelj onečišćenja sumporom u Rijeci (Alebić-Juretić i Arko-Pijevac, 1989), te analize bioakumulacije metala u lišajevima u općini Molve, gdje se nalaze objekti za crpljenje i preradu plina (Horvat i sur. 2000). Prije desetak godina provedena su dva istraživanja kvalitete zraka temeljena na istraživanjima bioraznolikosti lišajeva, na području sveučilišnog kampusa u Osijeku (Ozimec i sur., 2016) te u Motovunskoj šumi (Maslač i Partl, 2016).

U posljednjih 50 godina, studije koje koriste lišajeve kao bioindikatore/biomonitore značajno su porasle u broju te se proširile, u smislu korištenja različitih parametara, tehnika praćenja i

područja uzorkovanja (Abas, 2021). U sistematski pregled literature na temu korištenja lišajeva kao bioindikatora i biomonitora u posljednjih deset godina Abas (2021) je uključio 143 rada. Većina istraživanja provedena je u Europi, gdje prednjači Italija. Najviše su istraživana urbana područja s 75 radova (52 %), a slijede ih industrijska područja s 19 radova (14 %). Za biomonitoring lišajevima najčešće su korištene eksperimentalne metode, koje su uključivale laboratorijske analize i terensko uzorkovanje (75 %). Istraživačke metode, koje su uključivale kartiranje vrsta lišajeva, bile su također značajno zastupljene (23 %), dok su pregledni radovi bili zastupljeni u niskom broju. Prema analiziranim člancima, 58 % studija koristilo je native lišaje, dok je 41% koristilo transplantirane lišaje, a samo 2 % primijenilo je višestruke tehnike. Što se tiče parametara mjerenih u studijama, u najviše radova (58 %) su analizirani elementi u tragovima (npr. teški metali, PAH i sl.) a slijede ih istraživanja raznolikosti vrsta s 18%, višestruki parametri i fiziološke promjene s po 8 %, mjerenje elemenata dušika i sumpora s 5%, morfološke promjene s 2 % i analiza lebdećih čestica s 1 %. Tehnika monitoringa putem lokalnih nativnih lišajeva bila je znatno dominantnija u odnosu na tehniku transplantiranih lišajeva tijekom posljednjeg desetljeća (siječanj 2011. – svibanj 2020.). Isti autor zaključuje kako unatoč brojnim istraživanjima, ovi rezultati pokazuju da postoje mogućnosti za razvoj novih metoda, a takvi inovativni pristupi mogli bi dovesti do novih otkrića.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Grad Slavonski Brod sjedište je Brodsko-Posavske županije, koja se nalazi u istočnom dijelu Republike Hrvatske, i zajedno s pripadajućim općinama čini geografsku cjelinu Brodska Posavina. Geografska cjelina Brodska Posavina omeđena je Dilj gorom sa sjevera i rijekom Savom na jugu. Reljef je podijeljen na dva osnovna tipa; južni dio je nizina uz rijeku Savu a sjeverni dio su obronci Dilja s vrhovima od 90 do 200 m n.m. Prema Köppenovoj klasifikaciji klima pripada razredu Cfb, umjereno topla vlažna klima s toplim ljetom, čija su obilježja jasan godišnji hod srednje mjesečne temperature s maksimumom ljeti (od lipnja do kolovoza) i minimumom zimi (od prosinca do veljače). Prisavsku nizinu i njezinu lokalnu klimu, odlikuje visoka relativna vlažnost, češće pojave magle, posebno u proljeće i jesen, učestalije pojave mraza, te kraće trajanje insolacije (DLS, 2018). Srednja godišnja oborina u periodu 1996.-2018. godine iznosi 790,8 mm te je ravnomjerno raspoređena kroz godinu (Dvokut Ecro, 2022). Odabrala sam područje Slavanskog Broda za istraživanje i usporedbu različitih metoda istraživanja kvalitete zraka pomoću lišajeva, budući da se ovo područje ističe kao područje s lošom kvalitetom zraka, prvenstveno zbog blizine točkastog izvora onečišćenja - rafinerije nafte u Bosanskom Brodu, što je detaljno opisano u narednom potpoglavlju.

3.1.1. Onečišćenje zraka u Slavanskom Brodu

Mjerenje onečišćenja zraka ključno je za razumijevanje kvalitete zraka i utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš. Podaci se prikupljaju pomoću mreže automatskih mjernih postaja koje kontinuirano analiziraju uzorke zraka. Europske i nacionalne agencije često objavljuju ove podatke javno kako bi građani mogli pratiti razine onečišćenja u svojim sredinama, pa su tako u Hrvatskoj ti podaci dostupni na stranicama nadležnog ministarstva (trenutno je to Ministarstvo zaštite okoliša i zelene tranzicije), odnosno na web portalu „Kvaliteta zraka u Republici Hrvatskoj“ (MZOZT, 2024). Istraživanje za ovu doktorsku disertaciju provedeno je u periodu prosinac 2015. – lipanj 2016. godine, stoga su analizirani podaci iz godišnjih izvještaja o kvaliteti zraka za Republiku Hrvatsku 2010. – 2016. godine, koji su izrađeni od strane Državnog hidrometeorološkog zavoda, Agencije za zaštitu okoliša, Ekonergera i Instituta za medicinska istraživanja (MZOZT, 2024). Prema godišnjim izvještajima o kvaliteti zraka u Republici Hrvatskoj, glavni čimbenici koji doprinose lošijoj kvaliteti zraka uključuju gust promet, industrijske emisije i grijanje na fosilna goriva tijekom zimskih mjeseci, također,

spominje se i prekogranični transport onečišćenja. Dijelovi Hrvatske s najlošijom kvalitetom zraka obično su veća urbana središta i područja s industrijskom aktivnošću, a među područjima s lošom kvalitetom zraka (druga kategorija kvalitete zraka) često se ističe upravo Slavonski Brod, koji se nalazi u neposrednoj blizini rafinerije nafte. U Hrvatskoj se nalaze dvije rafinerije nafte (Rijeka i Sisak), no prema mjerenjima kvalitete zraka, najveći negativni utjecaj na kvalitetu zraka u Hrvatskoj uzrokuje upravo rafinerija u susjednoj Bosni i Hercegovini, smještena uz granicu u Bosanskom Brodu (MZOZT, 2024). Rafinerije nafte su industrijska postrojenja koja prerađuju sirovu naftu u korisne derivate poput benzina, dizela, maziva i drugih proizvoda. Tijekom ovog procesa, emitiraju se razne štetne tvari koje doprinose onečišćenju zraka, kao što su lebdeće čestice (PM) koje sadrže teške metale arsen, molibden, nikal, selen, vanadij i cink, olovo itd., sumporov dioksid, metan, ugljikov dioksid, dušikov oksid, postojani organski onečišćivači (POP, eng. *persistent organic pollutants*), hlapljivi organski spojevi (VOC) itd. (Ragothaman i Anderson, 2017).

Na području Slavonskog Broda nalaze se dvije postaje državne mreže za trajno praćenje kvalitete zraka „Slavonski Brod – 1“ (početak rada: 30.01.2010.; kasnije u tekstu SB-1) i „Slavonski Brod -2“ (početak rada: 01.08.2014.; kasnije u tekstu SB-2). Prije no što je uspostavljena mjerna postaja SB-2, na nešto malo manje od godinu dana na obližnjem mjestu nalazila se privremena mjerna postaja, no ona nije prezentirana u godišnjim izvješćima.

Prema godinama i onečišćujućim tvarima u razdoblju 2010.-2016. godine napravila sam pregled utvrđenih kategorija kvalitete zraka u Slavonskom Brodu (Tablica 1). Na temelju razina onečišćenosti, s obzirom na propisane granične vrijednosti te ciljne vrijednosti, utvrđuju se kategorije kvalitete zraka (I i II kategorija) za svaku godinu. Također, prilikom izrade tablice uzela sam u obzir i dodatne pokazatelje za koje je određena kategorija kvalitete zraka (dugoročne ciljeve i ciljne vrijednosti za prizemni ozon u zraku; ovisno o svojstvima onečišćujuće tvari: gornji i donji pragovi procjene, ciljne vrijednosti; pokazatelji prosječne izloženosti za lebdeće čestice PM_{2.5}; ciljano smanjenje izloženosti na nacionalnoj razini; koncentracija izloženosti; kritične razine; prag upozorenja; prag obavješćivanja i posebne mjere zaštite zdravlja ljudi). Stoga, primjerice, ako je kvaliteta zraka prema godišnjoj srednjoj koncentraciji onečišćujuće tvari određena kao kategorija I, odnosno da zrak nije onečišćen, ali je prema razini onečišćenosti u odnosu na neki od dodatnih pokazatelja zrak kategorije II, odnosno da je zrak neočišćen, onda je obojanost u tablici u skladu s najvišom ocjenom za tu onečišćujuću tvar, tj. najgore kategorije.

Tablica 1 Pregled kategorija kvalitete zraka prema analizi godišnjih izvještaja (MZOZT, 2024). Crveno je označena najlošija kategorija, žuto srednja, a zeleno najbolja kategorija kvalitete zraka, s obzirom na određenu onečišćujuću tvar.

Godina / onečišćujuća tvar	2010. ¹	2011.	2012.	2013.	2014.	2015. ²	2016.
PM ₁₀	Nije mjereno					II, II	II, II
PM _{2.5}	III	II	II	II	I	II	II, II
SO ₂	I	I	I	I	I	I, I	I
H ₂ S	III	II	II	II	II	II, II	II, II
NO ₂	I	I	I	I	I	I, X	I, X
O ₃	I	II	II	II	I	I	I
benzen	Nije mjereno	I	I	I	I	I, X	I
CO	Nije mjereno					X, I	X, I
As u PM ₁₀	Nije mjereno					I, X	I, X
Cd u PM ₁₀	Nije mjereno					I, X	I, X
Ni u PM ₁₀	Nije mjereno					I, X	I, X
Pb u PM ₁₀	Nije mjereno					I, X	I, X
BaP u PM ₁₀	Nije mjereno					II, X	II, X
Analiza PM _{2.5} ³	Nije mjereno					?	Nije mjereno
SO ₂ i NO _x za zaštitu veg.	Nije određeno				*	*	Nije određeno

¹ Stare kategorije kvalitete zraka do 2010. godine (I- čist ili neznatno onečišćen zrak, II- umjereno onečišćen zrak, III- prekomjerno onečišćen zrak), od 2010. godine nove kategorije kvalitete zraka (I- čist ili neznatno onečišćen zrak, II-onečišćen zrak)

² od 2015 se određuju kategorije i za postaju SB-2 (zato su u kolonama za 2015. i 2016. godinu navedene dvije kategorije, za obje postaje; X označava kada nema mjerenja za tu onečišćujuću tvar na toj postaji)

³ Uredbom o razinama onečišćujućih tvari u zraku nisu propisane granične/ciljne vrijednosti za EC, OC anione i katione u frakciji lebdećih čestica PM_{2.5} te se ne može provesti kategorizacija kvalitete okolnog zraka sukladno Zakonu o zaštiti zraka.

*Drugačija je kategorizacija od drugih, odnosno, crveno je označeno kada je prekoračen gornji prag procjene

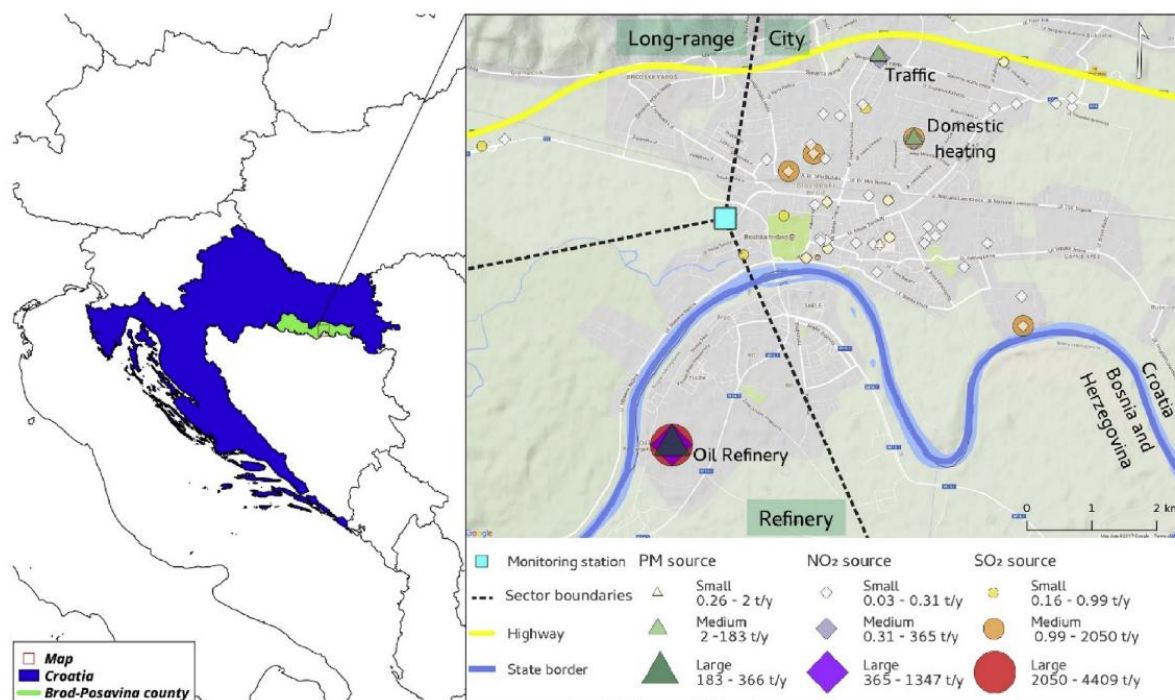
Kao što je vidljivo iz analize dostupnih izvještaja, kvaliteta zraka u Slavonskom Brodu svrstana je u najlošiju kategoriju za veći broj mjerenih onečišćujućih tvari, s manjim razlikama kroz godine. Bitno je napomenuti kako Uredbom o razinama onečišćujućih tvari u zraku (ni europskim direktivama) nisu propisane granične/ciljne vrijednosti za EC, OC anione i katione u frakciji lebdećih čestica PM_{2.5} te se za te onečišćujuće tvari, koje su mjerene samo u 2015. godini, ne može provesti kategorizacija kvalitete okolnog zraka sukladno Zakonu o zaštiti zraka (označeno plavom bojom u Tablici 1). Također, bitno je napomenuti kako su granične

vrijednosti koncentracija onečišćujućih tvari pomoću kojih se određuje kvaliteta zraka često određene samo kao godišnji prosjek, što znači da se mogu desiti prekoračenja granične vrijednosti tijekom godine, ali dok god se ne prijeđe godišnji prosjek, smatra se da je kvaliteta zraka I. kategorije s obzirom na tu onečišćujuću tvar.

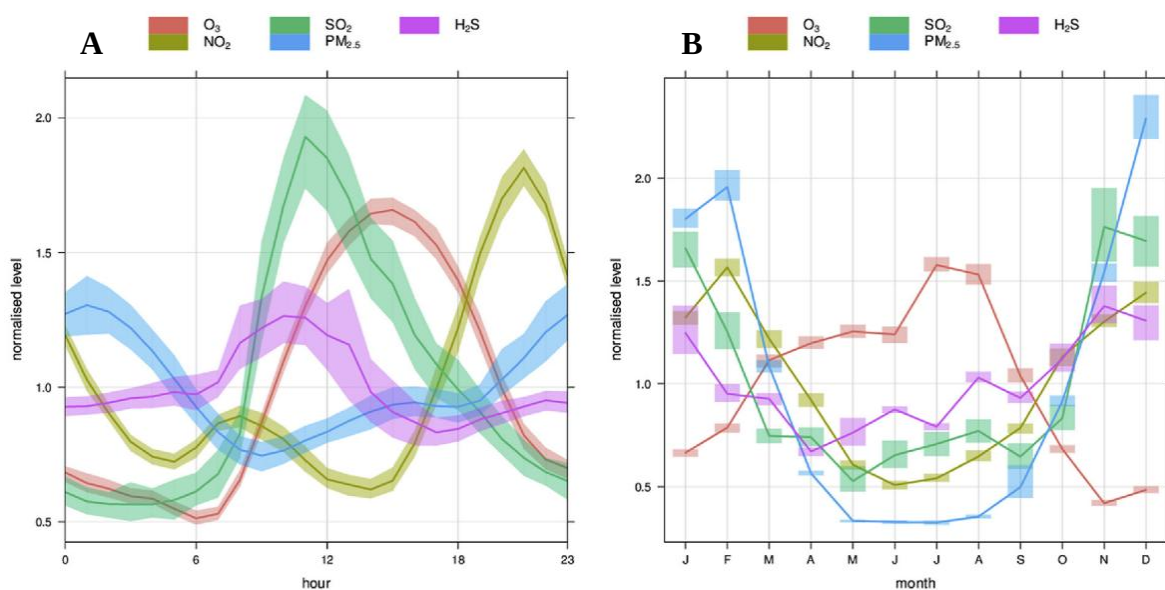
Zakonom o zaštiti zraka propisano je da ukoliko u određenoj zoni ili aglomeraciji razine onečišćujućih tvari u zraku prekoračuju bilo koju graničnu vrijednost ili ciljnu vrijednost, u svakom od tih slučajeva donosi se akcijski plan za poboljšanje kvalitete zraka za tu zonu ili aglomeraciju kako bi se, u što je moguće kraćem vremenu, osiguralo postizanje graničnih ili ciljnih vrijednosti. Tako su za Slavonski Brod donesena tri akcijska plana (DLS, 2018; Dvokut Ecro, 2022; Ekonerg, 2016), gdje je ovaj iz 2016. godine najrelevantniji za period ovog istraživanja, a fokus mu je bio primarno na H_2S i $\text{PM}_{2.5}$, za koje je zabilježeno kontinuirano prekoračenje graničnih vrijednosti. Zaključeno je kako je Rafinerija nafte Brod dominantni izvor sumporovodika u Slavonskom Brodu, tj. odgovorna je za prekoračenja graničnih vrijednosti tog plina. Također, preliminarni proračuni emisija pokazali da su rafinerija i ložišta na drva glavni lokalni izvori emisija čestica $\text{PM}_{2.5}$, dok cestovni promet ima manji utjecaj.

S obzirom na to da je ovaj akcijski plan sadržavao samo preliminarne i ograničene analize, kao podlogu za ovu disertaciju korišteni su podaci objavljeni u radu Jeričević i sur. (2019), koji su odredili doprinos izvora onečišćenja u složenim urbanim područjima, posebno onima koju su pod utjecajem velikih točkastih izvora poput rafinerija nafte, na primjeru Slavonskog Broda. Pri tome su uzeti podaci vrijednosti onečišćujućih tvari s postaje SB-1 za period 2010. – 2014. godine, koji su analizirani pomoću različitih metoda (Pozitivna faktorizacija matrice - PMF, Kondicionalna bivarijantna funkcija vjerojatnosti - CBPF) zajedno s meteorološkim podacima prikupljenima na istoj postaji. Također, analiziran je i sadržaj $\text{PM}_{2.5}$ iz 2015. godine sa postaje SB-2. Za potrebe analize potencijalnih izvora onečišćenja sagledani su podaci iz 2013. godine iz baze podataka Registra onečišćavanja okoliša (ROO), gdje se nalazi popis obveznika prijave podataka o emisijama onečišćujućih tvari u zrak (Slika 2). Rezultati su pokazali kako je obližnja rafinerija nafte glavni izvor onečišćenja zraka, pretežno doprinoseći emisijama SO_2 i H_2S , te sa značajnim utjecajima na razine NO_2 i $\text{PM}_{2.5}$. Također, analiza podataka pokazala je kako se najveće koncentracije $\text{PM}_{2.5}$ (oko $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$), NO_2 (oko $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$), SO_2 (oko $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$) i H_2S (oko $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$) obično javljaju tijekom hladnijih mjeseci (Slika 3). S druge strane, koncentracije ozona (O_3) najviše su (oko $70 \mu\text{g}/\text{m}^3$) kada je povećana fotolitička aktivnost, što se najčešće događa oko podneva tijekom ljeta. Nadalje, u radu Jeričević i sur. (2019) je zaključno istaknuta

važnost uključivanja meteoroloških čimbenika (kao što su brzina i smjer vjeta) u određivanje koncentracije onečišćujućih tvari u zraku.



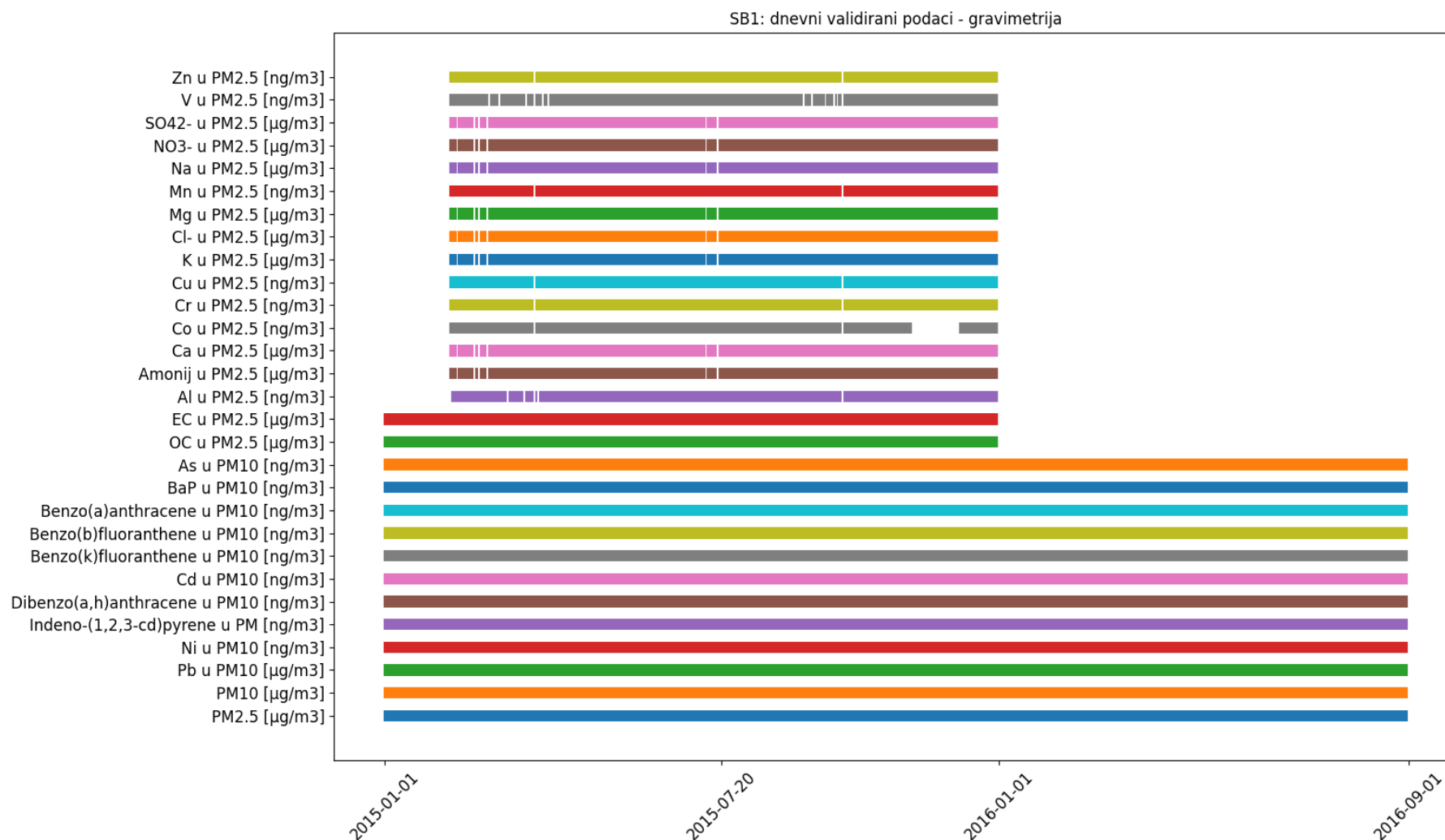
Slika 2 Područje istraživanja iz rada Jeričević i sur. (2019), s lokacijama mjerne postaje SB-1, industrijskih točkastih izvora emisija (Registar onečišćavanja okoliša (ROO)) u Slavonskom Brodu (Hrvatska) te rafinerije nafte u Bosni i Hercegovini preko državne granice (rijeka Sava). Količine emisija za PM, NO₂ i SO₂ tijekom 2013. godine prikazane su na karti različitim simbolima te veličinama koje odgovaraju procijenjenim godišnjim emisijama. Isprekidane linije razdvajaju područja različitih izvora onečišćenja (sektora) - dalekosežni izvori (sjeverozapad), gradski izvori (sjeveroistok-jugoistok), te rafinerija nafte (jug-jugozapad). Preuzeto iz Jeričević i sur. (2019).



Slika 3 Normalizirane prosječne dnevne (A) i godišnje (B) vrijednosti koncentracija različitih onečišćujućih tvari na mornoj postaji SB-1 u periodu 2010. – 2014. godine. Preuzeto iz Jeričević i sur. (2019).

Preuzela sam tablične podatke s online portala „Kvaliteta zraka u Republici Hrvatskoj“ (MZOZT, 2024) koji se odnose na mjerenja onečišćujućih tvari i meteorološke podatke s dvije mjerne postaje u Slavonskom Brodu za razdoblje od siječnja 2010. do srpnja 2016. godine. Za dodatna meteorološka mjerenja zatražila sam podatke izravno od Državnog hidrometeorološkog zavoda, budući da na online portalu nisu bili dostupni svi potrebni podaci. Analiza mjerenja onečišćujućih tvari pokazala je da su mjerenja metala započela tek 1. siječnja 2015. godine, a većina metala bila je mjerena samo tijekom te jedne godine (Slika 4). Ova situacija jasno se odražava i u analizi izvještaja o kvaliteti zraka koju sam izradila (Tablica 1).

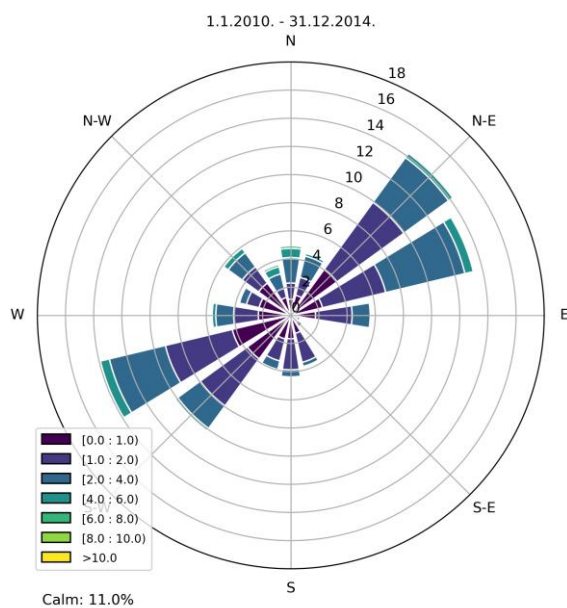
U postojećim akcijskim planovima poboljšanja kvalitete zraka za Slavonski Brod su ruže vjetrova zastarjele. Naime, akcijski plan iz 2016. godine sadržava ružu vjetrova samo za 2013. godinu (Ekonerg, 2016), dok akcijski plan iz 2018. koristi podatke za razdoblje od 1966. do 1975. godine (DLS, 2018). Akcijski plan iz 2022. godine obuhvaća razdoblje od 1981. do 2006. godine (Dvokut Ecro, 2022). U radu Jeričević i sur. (2019) napravljena je nova ruža vjetrova s podacima s mjerne postaje SB-1, od početka njenog rada 2010. godine do kraja 2014. godine, što je relevantniji postojeći opis vjetrova na ovom području za ovaj period istraživanja. Ova ruža vjetrova pokazuje da je najčešći vjetar iz smjerova sjeveroistoka (NE) i jugozapada (SW), što je karakteristično za Panonsku nizinu (Zaninović i sur., 2008). U Slavonskom Brodu između 2010. i 2014. godine zabilježene su visoke brzine vjetra iz smjerova sjevera (N) i sjeverozapada (NW).



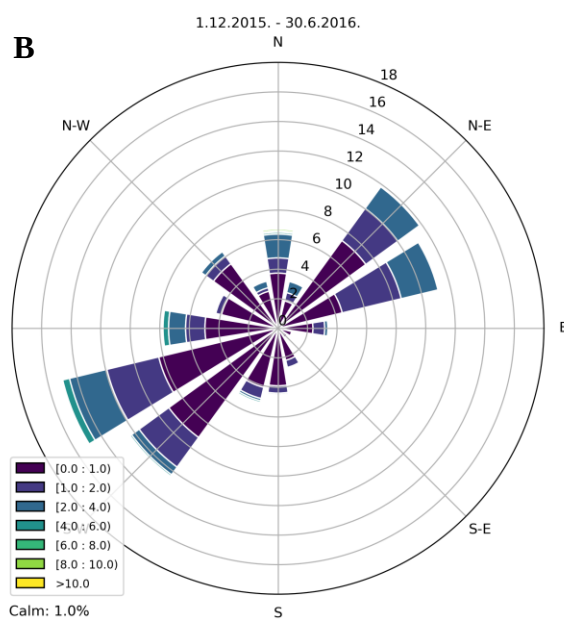
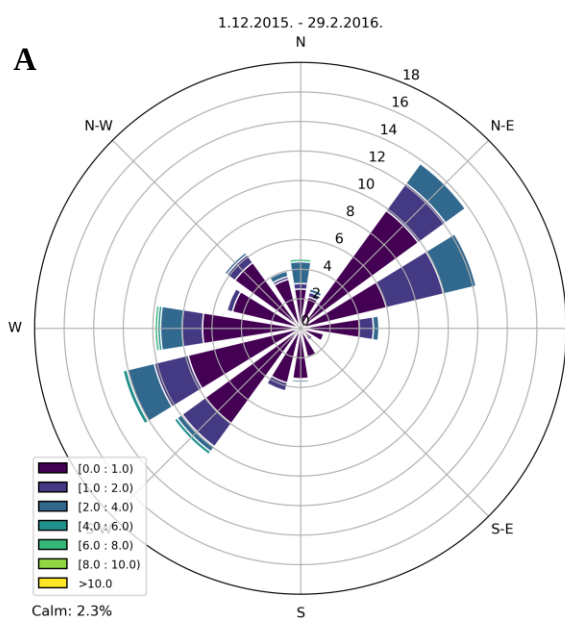
Slika 4 Pregled vremenskog razdoblja u kojem postoje podaci za teške metale i druge spojeve koji se mjere iz $PM_{2.5}$ i PM_{10} , a s obzirom na period istraživanja. Ne postoje navedeni podaci prije 1.1.2015. godine. Izrađeno iz podataka za mjernu postaju Slavonski Brod – 1, dostupnih na online portalu Kvaliteta zraka u Republici Hrvatskoj (MZOZT, 2024).

3.1.2. Podaci o vjetru za Slavonski Brod

Kako bih u analize mogla uključiti parametre vezane uz vjetar (srednju brzinu i frekvenciju vjetra prema smjeru) bilo je potrebno izraditi ruže vjetrova. To sam učinila iz podataka s mjerne postaje „Slavonski Brod - 1“ (SB-1), a dobivenih od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ) na zahtjev. Postaja se nalazi na mjestu istraživačke plohe 7, koja je definirana i prikazana kartografski u potpoglavlju 3.2.1. Podaci za vjetar su izračunati (Tablica 2) i prikazani na ružama vjetrova za određene periode (Slika 5, Slika 6): period prije sakupljanja nativnih lišajeva (2010. – 2014.; Nat) te periodi u kojima su transplantirani lišajevi izloženi na području Slavanskog Broda, T1 (1.12.2015. – 29.02.2016.) i T2 (1.12.2015. – 30.06.2016.). S obzirom da ruža vjetrova predstavlja sliku iz kojeg smjera puše vjetar, a nama je trebao podatak o prosječnoj brzini i frekvenciji vjetra iz smjera rafinerije, bilo je potrebno te uzlazne podatke obrnuti.



Slika 5 Ruža vjetrova za područje Slavonskog Broda za period prije sakupljanja nativnih lišajeva. „Calm“ označava uvjete tišine. Brojevi u legendi označavaju brzinu vjetra (m/s), dok brojevi na kružnici označavaju čestinu vjetra (%).



Slika 6 Ruže vjetrova za područje Slavonskog Broda za periode u kojima su transplantirani lišajevi izloženi na području Slavonskog Broda: T1 (A; 1.12.2015. - 29.02.2016.) i T2 (B; 1.12.2015. - 30.06.2016.). „Calm“ označava uvjete tišine. Brojevi u legendi označavaju brzinu vjetra (m/s), dok brojevi na kružnici označavaju čestinu vjetra (%).

Tablica 2 Podaci za vjetar za određene periode, izračunati iz podataka DHMZ-a. Periodi su prije sakupljanja nativnih lišajeva (2010.-2014.; Nat) te za periode u kojima su transplantirani lišajevi izloženi na području Slavonskog Broda: T1 (1.12.2015. -29.02.2016.) i T2 (1.12.2015. - 30.06.2016.). w_frq - učestalost vjetra koji dolazi iz smjera rafinerije, w_spd - srednja brzina vjetra iz smjera rafinerije. Ovo su podaci prije „obrtanja“ spram pozicije istraživačkih ploha, što je opisano gore u tekstu.

Smjer vjetra (iz kojeg puše)	Nat w_frq (%)	Nat w_spd (m/s)	T1 w_frq (%)	T1 w_spd (m/s)	T2 w_frq (%)	T2 w_spd (m/s)
N	4,42	2,42	4,67	1,54	6,64	1,29
NNE	4,04	1,75	2,68	0,58	3,26	1,10
NE	12,68	1,61	13,47	0,85	11,71	1,01
ENE	11,90	2,01	11,94	1,21	11,08	1,39
E	5,05	1,44	5,18	0,71	3,34	0,74
ESE	0,61	0,80	1,57	0,36	0,98	0,44
SE	0,90	0,89	0,97	0,38	0,79	0,42
SSE	3,32	1,22	1,94	0,34	2,69	0,61
S	3,92	1,27	3,56	0,54	4,44	0,60
SSW	3,57	1,29	4,44	0,62	5,11	0,73
SW	9,05	1,41	10,32	0,80	12,24	0,78
WSW	12,41	1,71	12,12	1,08	14,84	1,18
W	4,99	1,52	9,67	1,10	7,80	1,19
WNW	3,43	1,13	5,00	0,43	4,36	0,53
NW	5,36	1,62	6,20	0,49	6,39	0,62
NNW	3,35	2,32	3,93	0,62	3,28	0,77
Mirno	10,99		2,31		1,02	

3.1.3. Rafinerija nafte u Bosanskom Brodu

Do sada, niti jedan izvještaj ili rad koji se bavi kvalitetom zraka u Slavonskom Brodu nije uključivao podatke o koncentracijama emisija onečišćujućih tvari iz same rafinerije. Unatoč pokušajima da putem osobne komunikacije dođem do tih podataka od nadležnog ministarstva u Republici Srpskoj, nisam uspjela. Informacije o rafineriji preuzete su s njihovih službenih web stranica (Rafinerija nafte Brod, 2024). Prema navedenim podacima, „Rafinerija nafte Brod“ a.d. proizvodi naftne derivate koji se koriste u industriji, građevinarstvu, transportu i domaćinstvima, te se opskrbljuje sirovom naftom putem Jadranskog naftovoda (JANAF), što omogućuje njezin kontinuirani rad. Sirova nafta se skladišti unutar Terminala i u krugu rafinerije, pri čemu je ukupni kapacitet prerade 4.200.000 tona godišnje. Proizvodi uključuju motorne benzine, dizel goriva, bitumene, ukapljeni naftni plin, lož ulje i sumpor.

3.2. Eksperimentalni dizajn

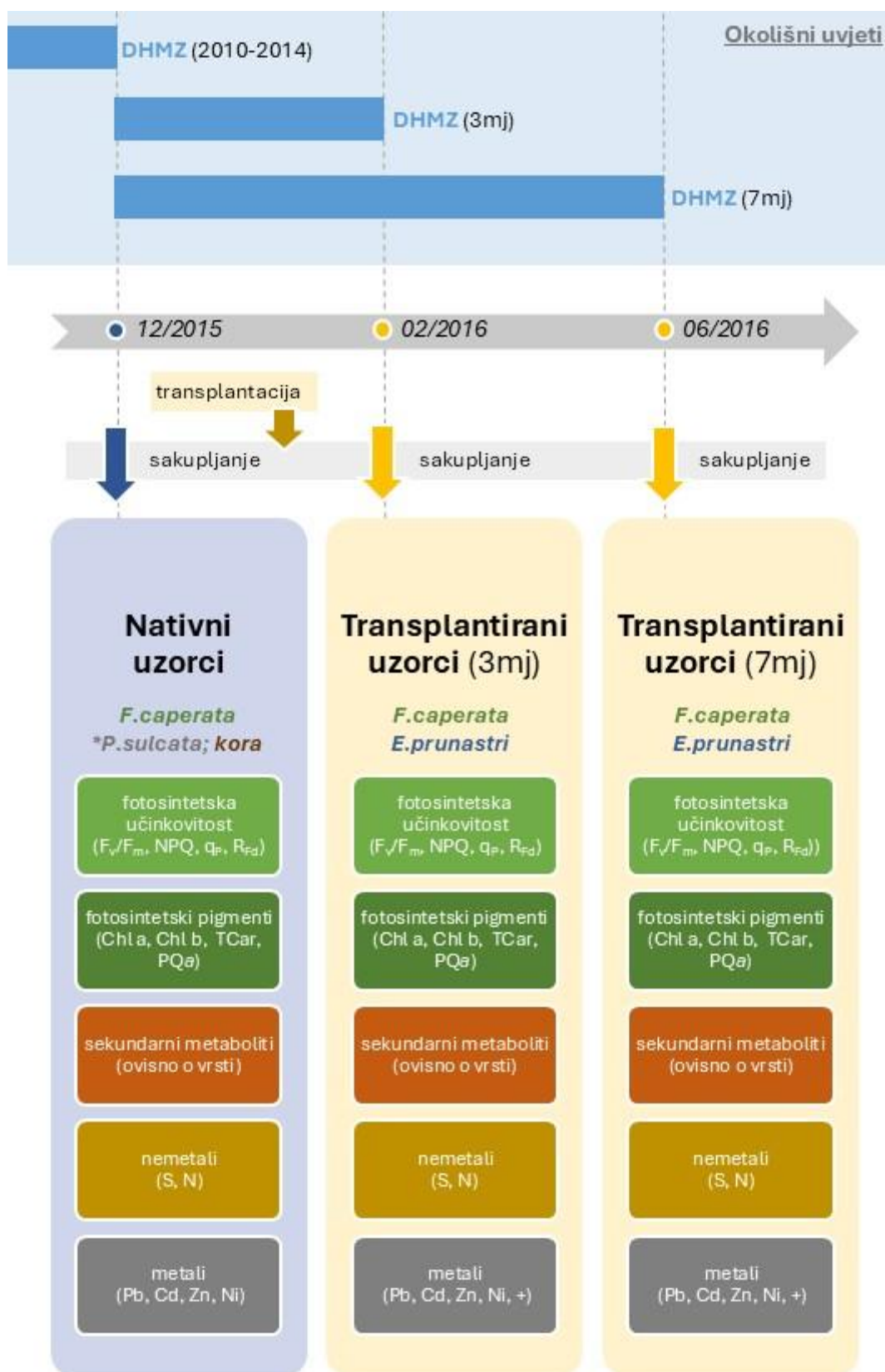
Kako bih ostvarila ciljeve ove disertacije i istražila zadane hipoteze, dizajnirala sam istraživanje na način da postavim istraživačke plohe u radijusu oko snažnog izvora onečišćenja, u ovom slučaju rafinerije u Bosanskom Brodu, objedinjujući na istim plohama dva pristupa uzorkovanja (nativne i transplantirane lišajeve) te istražujući različite indikatore fizioloških promjena u lišajevima izazvanih onečišćenjem zraka te koncentracije određenih metala i nemetala.

Prilikom planiranja lokacija za postavljanje ploha, analizirala sam različite podloge u GIS okruženju, kao što su podaci Državne Geodetske Uprave (Državna geodetska uprava, 2015), odnosno topografske karte i digitalni ortofoto, te baza podataka HŠ fond (Hrvatske šume, 2015). Također, provedeno je preliminarno terensko istraživanje, kako bi se utvrdila stvarna dostupnost pojedinih lokacija i potvrdila prisutnost lišajeva.

Nakon pregleda stanja tijekom preliminarnog terenskog istraživanja, odlučila sam se kao nativne (kasnije u tekstu: Nat) lišajevima koristiti prvenstveno vrstu *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, koja je, s obzirom na tip staništa i klimu na području istraživanja, bila najbrojnija na odgovarajućim stablima (hrast). U slučaju kada nije bilo dovoljno te vrste, uzorkovala sam vrstu *Parmelia sulcata* Taylor, ili koru hrasta u slučaju kada uopće nije bilo lišajeva. Za transplantirane lišajevima odlučila sam koristiti vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach., te vrstu *F. caperata*, kako bih mogla dobivene rezultate uspoređivati s rezultatima nativnih lišajeva.

Analizom dostupnih podataka ustanovljeno je da kvaliteta zraka u ovom području pokazuje značajnu sezonalnost (Jeričević i sur., 2019). Tijekom zime, zabilježene su najviše koncentracije većine onečišćujućih tvari, dok koncentracija ozona raste u proljeće s povećanim sunčevim zračenjem, jer je ozon sekundarni onečišćivač koji nastaje fotooksidacijskim procesima u atmosferi, uz prisutnost prekursora poput NO_x i benzena. U skladu s tim, istraživanje u okviru ovog rada obuhvatilo je nativne uzorke lišajeva, kao i transplantirane uzorke prikupljene u dva vremenska razdoblja: nakon završetka zimske (kasnije u tekstu: T1) i nakon završetka proljetne sezone (kasnije u tekstu: T2).

Detalji terenskih i laboratorijskih istraživanja lišajeva objašnjeni su u narednim potpoglavljima, dok je eksperimentalni dizajn pregledno prikazan ovdje (Slika 7).



Slika 7 Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna ove disertacije, s vremenskim periodima prikupljenih podataka za okolišne uvijete (DHMZ – Državni hidrometeorološki zavod) te vremenom prikupljanja nativnih uzoraka (prosinac 2015.), transplantacije (prosinac 2015.) te sakupljanja izloženih transplantiranih uzoraka nakon tri mjeseca (veljača 2016.) i sedam mjeseci (lipanj 2016.). Uzorkovane su vrste: *Flavoparmelia caperata*, *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri*. Navedeni su mjereni parametri detaljnije opisani u tekstu.

3.2.1. Terenska istraživanja lišajeva

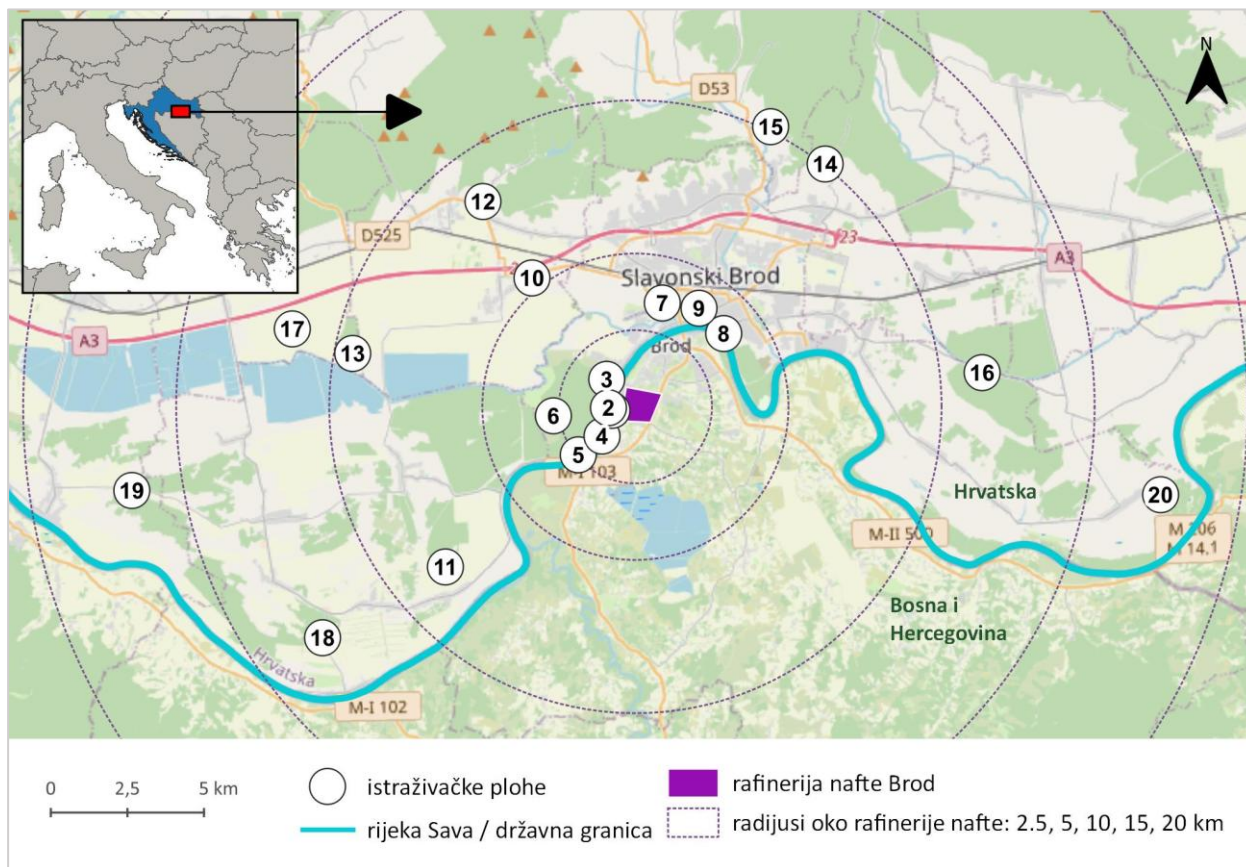
Kako bi se istražili biološki relevantni utjecaji onečišćenja zraka uzrokovanog obližnjom rafinerijom (Slika 8), postavljeno je 20 istraživačkih ploha za uzorkovanje u krugu od 20 km od rafinerije nafte u Bosanskom Brodu (Prilog 1 – koordinate centroida ploha).



Slika 8 Pogled na rafineriju nafte u Bosanskom Brodu, s vidljivim dimom. Fotografirano s hrvatske obale Save, tijekom terenskog istraživanja u prosincu 2015. godine (autor: Maja Maslač Mikulec).

Veća gustoća ploha postavljena je bliže rafineriji, gdje se očekivao veći utjecaj zbog blizine točkastog izvora onečišćenja. Konkretno, postavljeno je pet ploha u radijusu 0-2,5 km, po četiri u radijusu 2,5-5 km, odnosno 5-10 km, pet u radijusu 10-15 km i dvije plohe u radijusu 15-20 km (Slika 9). Istraživačke plohe bile su smještene na rubovima nizinskih hrastovih šuma, a uzorci su prikupljeni samo na hrvatskoj strani granice. Ploha broj 7 je postavljena u blizini mjerne postaje SB-1, dok je ploha broj 8 postavljena u blizini mjerne postaje SB-2. Iako ovdje nismo radili istraživanje same bioraznolikosti lišajeva, koja se također koristi za određivanje kvalitete zraka, držala sam se standarda propisanih za uzorkovanje lišajeva za takva istraživanja (BS EN 16413, 2014), kako bi uzorci bili sakupljeni u ujednačenim uvjetima, odnosno da je stablo na kojem se uzorkuje definirano na sljedeći način: a) predstavlja odgovarajuću vrstu; b)

ima opseg debla (na 130 cm od razine tla) između 50 i 250 cm; c) deblo ima nagib manji od 20°. Također, uzorkovani su samo lišajevi iznad 1 metar od tla, kako bi se umanjio utjecaj čestica tla te eutrofikacija uzrokovana životinjama.



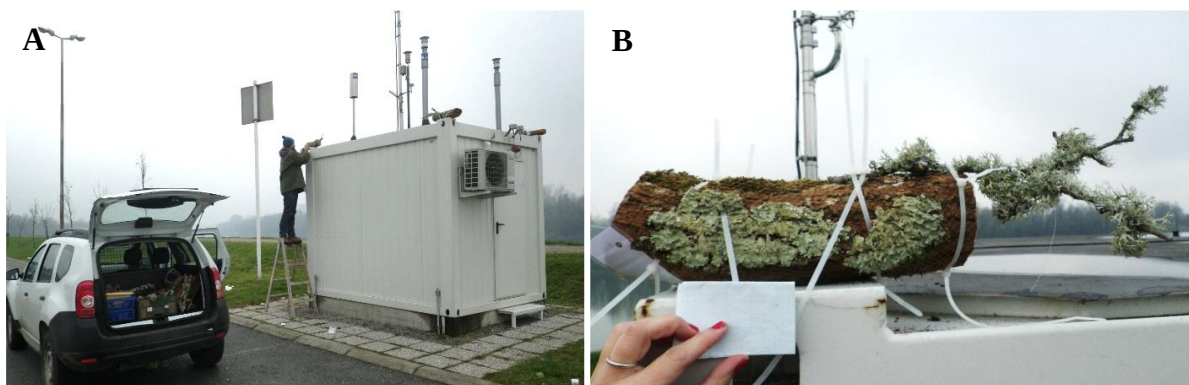
Slika 9 Istraživano područje s lokacijama istraživačkih ploha (1-20), grad Slavonki Brod (Hrvatska) i rafinerija nafte u Bosni i Hercegovini preko državne granice (rijeka Sava). Istraživačka ploha 1 nije jasno vidljiva jer se nalazi blizu istraživačke plohe 2, pa se oznake preklapaju. Osnovna karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.

Na odabranim istraživačkim ploham provedena su dva načina biomonitoringa: pasivno uz korištenje nativnih uzoraka lišajeva i aktivno uz korištenje transplantiranih uzoraka. Uzorci su pohranjeni u papirnatu vrećicu i čuvani na suhom mjestu i sobnoj temperaturi (20 do 25 °C) do analize fotosintetske učinkovitosti u roku od deset dana od uzorkovanja. Nakon toga, uzorci su čuvani na hladnom (-18 °C) i suhom mjestu do završetka preostalih analiza. Iako uzorkovane vrste nisu strogo zaštićene, dopuštenje za prikupljanje lišajeva na širem području Slavonskog Broda dobiveno je od tadašnjeg nadležnog ministarstva (Ministarstva zaštite okoliša i prirode) (Prilog 2).

Na svakoj istraživačkoj plohi prikupila sam najmanje deset uzoraka nativnih lišajeva na visini od 1 do 3 m, s maksimalno 10 stabala po plohi (maksimalni polumjer plohe je bio 30 m). Osim toga, prikupljeni su dodatni podaci, uključujući veličinu uzorka, točnu visinu uzorkovanja,

orijentaciju lišajeva na stablu i procjenu gustoće vegetacije oko uzorka. Uzorkovala sam vrstu *F. caperata*, a u slučaju da nije bilo dovoljno jedinki te vrste ili da je nije bilo na svim ploham, uzorkovala sam vrstu *P. sulcata*. Na dvije plohe najbliže rafineriji gdje nisu nađeni lišajevi uzorkovana je kora hrasta.

Kao transplantate koristila sam dvije vrste lišajeva: *F. caperata* i *E. prunastri*. Jedinke obje vrste sakupljene su s područja obližnje Požeške gore (koordinate u HTRS96/Croatia TM: 599095, 5020318; 579360, 5022284), te su zatim postavljene na područje Slavenskog Broda, na istih 20 istraživačkih ploha s kojih su prikupljeni nativni uzorci. Na svaku plohu presađeno je minimalno devet jedinki svake vrste, po tri lišaja, odnosno grane u slučaju *E. prunastri*, na tri stabla po plohi. Uzorci su postavljeni u prosincu 2015. godine, a prikupljeni su u dvije vremenske točke, nakon završetka zime (veljača 2016. godine) i nakon završetka proljetne sezone (lipanj 2016. godine). U slučaju ploha 7 i 8, lišajevi su postavljeni i na same mjerne postaje, i to tako da je na jednu cjepanicu stavljen lišaj *F. caperata* te grančica s vrstom *E. prunastri*, što je onda pomoću plastičnih uzica pričvršćeno za rubove postaje (Slika 10). Na svim drugim ploham, lišaj *F. caperata* je pričvršćen za stablo pomoću plastične mrežice zajedno s tankim slojem kore na kojem je rastao, dok je lišaj *E. prunastri* stavljen zajedno s grančicama na kojima raste i pričvršćen pomoću tankog plastičnog konca na grane stabala na plohi (Slika 11).



Slika 10 Postavljanje transplantiranih lišajeva na mjernu postaju SB-2 (A) i detalj koji prikazuje cjepanicu na koju je postavljen lišaj *Flavoparmelia caperata* te grančica s vrstom *Evernia prunastri* (B) (autor: Maja Maslač Mikulec).



Slika 11 Transplantirani uzorci lišaja *Flavoparmelia caperata* na stablu (A) i *Evernia prunastri* na grani (desno) (autor: Maja Maslač Mikulec).

Tijekom trajanja eksperimenta s postavljenim transplantatima, na plohama 12 i 18, i to tijekom drugog perioda (T2), provedena je sječa stabala, zbog čega na tim plohama nije mogla biti prikupljena dovoljna količina uzoraka u T2.

3.2.2. Laboratorijske analize

3.2.2.1. Priprema uzoraka lišajeva

Prema novijoj literaturi preporuča se ručno čišćenje lišajeva i korištenja perifernih dijelova talusa, a napustilo se pranje uzoraka i korištenje cjelokupnih talusa (Cecconi i sur., 2019). Listaste lišajeve (*F. caperata* i *P. sulcata*) koji su pričvršćeni rizinama za podlogu bilo je potrebno očistiti od komadića kore i mahovina. To sam radila pod lupom i isključivo s plastičnim priborom, radi kasnije analize metala. Vrstu *E. prunastri* najčešće nije bilo potrebno čistiti, samo je pregledana i eventualno su odstranjene manje nečistoće. Prije pripreme uzoraka za ostale metode izmjerena je fluorescencija klorofila *a* na očišćenim lišajevima *in vivo*. Za ostale metode uzet je dio lišaja kako slijedi. Za native lišaje, za analizu sadržaja fotosintetskih pigmenata, sekundarnih metabolita, nemetala i metala, uzet je 1 cm talusa od ruba. Za transplantirane lišaje, kod vrste *F. caperata* uzet je samo rub rasta (nekoliko milimetara), gdje je donja strana talusa smeđe boje, ali još ne postaje crna s rizinama. Naime, smatra se da je to zona najveće fiziološke aktivnosti te se često uzima samo taj dio za analize transplantata (Loppi i sur., 2004). Kod vrste *E. prunastri* korištene su samo "vanjske grane", koje su odstranjene i usitnjene plastičnim škarama.

3.2.2.2. Fotosintetska učinkovitost

Za analizu fotosintetske učinkovitosti, lišajevi su prije samog mjerenja stavljeni na filter papir u Petrijevoj zdjelici namočen u destiliranoj vodi kako bi se prilagodili laboratorijskim uvjetima ($60 \mu\text{mol fotona/m}^2\text{s}$ na $22 \pm 2^\circ\text{C}$) preko noći. Mjerenja fluorescencije klorofila izvršena su na lišajevima prilagođenim uvjetima tame tijekom 30 minuta, koristeći fluorimetar FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Brno, Češka Republika). Primijenjena je slaba modulirana svjetlost za mjerenje minimalne razine fluorescencije (F_0), a zatim kratki saturacijski bljesak svjetlosti ($> 3000 \mu\text{mol fotona/m}^2\text{s}$) za određivanje maksimalne razine fluorescencije (F_m). Minimalna i maksimalna razina fluorescencije u uvjetima svjetla, kao i razina fluorescencije u stanju ravnoteže (F_s), također su mjerene pomoću saturacijskih pulseva koji su primijenjeni uz aktiničko svjetlo ($100 \mu\text{mol fotona/m}^2\text{s}$). Parametri fluorescencije, uključujući maksimalni prinos fluorescencije (F_v/F_m) kao pokazatelj učinkovitosti fotosistema II, nefotokemijsko gašenje (NPQ) i fotokemijsko gašenje (q_p), izračunati su prema formulama iz rada Maxwell i Johnson (2000). Dodatno je određen i omjer smanjenja fluorescencije klorofila (R_{Fd}), koji korelira s potencijalnom fiksacijom CO_2 (Lichtenthaler i sur., 2005).

3.2.2.3. Fotosintetski pigmenti

Za analizu fotosintetskih pigmenata, ekstrahiran je usitnjeni talus lišaja (10-15 mg) u 1,5 ml dimetilsulfoksida, s dodatkom cca. 10 mg CaCO₃. Uzorci su zatim inkubirani 40 minuta u toploj (65 °C) ultrazvučnoj kupelji te potom centrifugirani na 10 000 g 10 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatanti su odvojeni i korišteni za spektrofotometrijska mjerenja (UV-VIS spektrofotometar Specord 40, Analytik Jena AG, Jena, Njemačka). Kvantifikacija klorofila *a* i *b* (Chl *a*, Chl *b*), karotenoida (TCar) i degradacije klorofila, odnosno kvocijent feofitinizacije (eng. *phaeophytinization quotient*; PQa) napravljena je prema postojećim radovima (Lackovićová i sur., 2013; Yemets i sur., 2014), korištenjem formula:

$$\text{Chl } a = 12.19 \times (A_{665} - A_{750}) - 3.45 \times (A_{649} - A_{750})$$

$$\text{Chl } b = 21.99 \times (A_{649} - A_{750}) - 5.32 \times (A_{665} - A_{750})$$

$$\text{TCar} = (1000 \times (A_{480} - A_{750}) - 2,14 \text{ Chl } a - 70,16 \text{ Chl } b) / 220$$

$$\text{PQa} = (A_{435} - A_{750}) / (A_{415} - A_{750})$$

pri čemu su A₄₁₅, A₄₃₅, A₄₈₀, A₆₄₉, A₆₆₅, A₇₅₀ apsorbancije na određenim valnim duljinama.

3.2.2.4. Sekundarni metaboliti

Usitnjeni lišaj (10-15 mg) inkubiran je u 1,5 mL ohlađenog acetona u trajanju od 30 minuta na 4 °C (Feige i sur. 1993). Uzorci su potom centrifugirani 15 minuta na 4 °C i 15 000 g. Supernatant sam prebacila pipetom u novu mikroeprijetu, ponovo centrifugirala 20 minuta na 4 °C i 22 000 g i prebacila pipetom u tamne staklene bočice.

Kvalitativna i kvantitativna analiza sekundarnih metabolita napravljena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography* - HPLC) koristeći sustav Perkin Elmer Series 200 s UV/VIS diodnim nizom detektora. Analiti su razdvojeni na koloni punjenoj s C18 reverznom fazom (5 µm, 250 × 4,6 mm, Brownlee Spheri-5 ODS, Perkin Elmer, SAD) s predkolonom (5 × 4,6 mm). Razdvajanje analita je napravljeno prema metodi opisanoj u Feige i sur. (1993), uz određene modifikacije (Maslač i sur., 2016). Analizirano je najmanje tri uzorka po istraživačkoj plohi.

Mobilna faza sastojala se od dviju otopina: (A) 1 % (v/v) fosfatne kiseline u deioniziranoj vodi te (B) 100 % metanola. Elucijski program razdvajanja bio je sljedeći (navodi se samo za otopinu B, dok se za otopinu A podrazumijeva ostatak do 100 %): 0,5 minuta ekvilibracije s 30 % B, 5 minuta linearnog gradijenta od 30 % do 70 % B, 16 minuta linearnog gradijenta od 70 % do 100 % B, 7 minuta izokratno s 100 % B, 1 minuta linearnog gradijenta od 100 % do 30 % B i 10 minuta ponovne ekvilibracije s 30 % B (ukupno 39 minuta). Injekcijski volumen acetonskih

uzoraka bio je 20 μ l, brzina protoka 1 ml/min, temperatura peltijera 4 $^{\circ}$ C, temperatura kolone je bila sobna (oko 23 $^{\circ}$ C), a metaboliti su detektirani na 245 nm i prikazani kromatogramima.

Kako bih identificirala i kvantificirala pojedine sekundarne metabolite lišajeva, izolirala sam pojedine spojeve pomoću tankoslojne kromatografije (eng. *thin-layer chromatography* – TLC) prema postojećem standardiziranom postupku (Orange i sur., 2001). Za izolaciju pojedinih spojeva koje sam poslije koristila kao standarde uzela sam vrste lišajeva u kojima se pojedini metabolit nalazi u velikoj količini te koji ne sadrži neki drugi metabolit koji bi imao sličnu vrijednost retencijskog faktora (R_f) zbog čega bi se mogli preklapati na TLC pločici. Lišaj *F. caperata* sadrži protocetraričnu i usninsku kiselinu, dok lišaj *E. prunastri* sadrži everničnu i usninsku kiselinu te kloratranorin i atranorin. Za usninsku kiselinu sam koristila kupljeni standard (Sigma Aldrich), dok sam za protocetraričnu koristila vrstu *F. caperata*, za everničnu kiselinu vrstu *E. prunastri*, a za atranorin i kloratranorin vrstu *P. sulcata*. Kao mobilnu fazu za TLC odabrala sam standardnu otopinu G koja se koristi za identifikaciju lišajnih metabolita (toluen / etilacetat / mravlja kiselina u volumnim omjerima 139 : 83 : 8), jer sam željela dobro razdvajanje na niskim R_f vrijednostima. Za razdvajanje spojeva atranorina i kloratranorina sam koristila otopinu E (cikloheksan / etilacetat 75 : 25). Uzorke sam pripremila tako da sam na komadić tkiva lišaja (oko 20 mg) stavila 1 ml hladnog acetona i ekstrahirala 20 minuta. Uzorke sam kapilarno nanijela na donji rub pločice (20 x 5 cm) s ručno nanesenim silika-gelom. Zatim sam pločicu postavila uspravno u posudu s G otopinom, zatvorila posudu te ostavila da se uzorci razdvajaju oko 30-45 minuta. Pločicu sam zatim izvadila, ostavila da se osuši na zraku te fotografirala pod VIS i UV svjetlom (Vilber Lourmat; TFX – 20 M, 6 x 15 w – 312 nm tube) kako bih identificirala pojedine spojeve koji zbog svoje strukture fluoresciraju pod UV svjetlom. Dodatno sam na neke pločice raspršivačem nanijela 10 % sumpornu kiselinu te stavila u sušionik na +110 $^{\circ}$ C 10-tak minuta kako bi se razvilo karakteristično obojenje (Orange i sur., 2001) i ponovno fotografirala pod VIS i UV svjetlom. Na taj način sam identificirala položaj pojedinih spojeva. Za izolaciju spojeva s TLC pločice sam pažljivo skinula silika-gel u području u kojem je pojedini spoj/ metabolit bio vizualiziran, a prije koraka sa sumpornom kiselinom. Na silika-gel sam dodala 1,5 ml hladnog acetona i pustila preko noći na 4 $^{\circ}$ C. Centrifugirala sam na 15 000 g 15 minuta na 4 $^{\circ}$ C te sam supernatant uparila u eksikatoru pod vakuumom (Thermo Fisher Scientific). Zatim sam u testnu tubicu dodala 500 μ l metanola te vorteksirala 2 minute kako bi se spoj otopio. Za svaki spoj izmjerila sam UV spektar i odredila specifične apsorpcijske maksimume te na temelju vrijednosti apsorpcije i pomoću poznatih molarnih

ekstinkcijskih koeficijenata za svaku pojedinu tvar (Huneck i Yoshimura, 1996) odredila koncentraciju izoliranih spojeva pomoću Lambert-Beerovog zakona.

Otopine pojedinih spojeva poznatih koncentracija koristila sam kao HPLC standarde za izradu kalibracijskog pravca i određivanje retencijskog vremena svakog spoja. Usporedbom kromatograma dobivenih snimanjem pojedinih standarda i onih dobivenih razdvajanjem uzoraka lišajeva identificirala sam pojedine spojeve na temelju identičnog retencijskog vremena, dok sam usporedbom površina ispod pika pojedinog spoja iz uzoraka s površinama odgovarajućeg standarda poznatih koncentracija izračunala koncentraciju tog spoja.

3.2.2.5. *Nemetali*

Sadržaj nemetala (dušika i sumpora) u nativnim i transplantiranim uzorcima lišajeva analiziran je od strane kolega na Odsjeku za agroekologiju, Zavod za opću proizvodnju bilja, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Detekcija i kvantifikacija ukupnog dušika (N) i sumpora (S) u uzorcima lišajeva (25 ± 2 mg) provedena je simultano, metodom suhog spaljivanja po Dumasu na Vario, Macro CHNS analizatoru, Elementar (2006). Ukupni dušik i sumpor kvantificirani su izračunavanjem površine ispod pika koja je proporcionalna postotku dušika i sumpora u uzorku. Točnost i preciznost analiza kontrolirana je pomoću referentnih materijala IPE 154, IPE 181, IPE 240 Wepal (Wageningen Evaluating Programmes), pri čemu je svaki deseti uzorak bio referentni materijal, s prihvatljivim rezultatima točnosti: oporavak $< 3\%$; preciznost: $RSD < 3\%$. Najmanje tri ponavljanja su izmjerena za svaku plohu. Kako na dvije plohe najbliže rafineriji nafte nisu nađeni nativni lišajevi analizirani su uzorci kore istom metodom.

3.2.2.6. *Metali*

Sadržaj metala u nativnim uzorcima lišajeva analiziran je od strane kolega u Laboratoriju za tlo i otpad, Odjel za životni i radni okoliš, Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar. Masa od 100 mg uzorka se pripremila mikrovalnom razgradnjom u skladu s metodom HRN EN 13657:2008 na uređaju Mikrovalna ETHOS SEL Milestone. Sadržaj metala zatim se odredio induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrijom masa (ICP-MS), na instrumentu ICP MS ELAN DRC-e Perkin Elmer (2008), u skladu s metodom HRN EN ISO 17294-1,2:2008. Uvjeti na instrumentu i granice detekcije i kvantifikacije navedeni su u prilogu (Prilog 3, Prilog 4). U nativnim uzorcima analiziran je sadržaj četiri metala: olova, cinka, kadmija i nikla (Tablica 3). Najmanje tri replike su analizirane za svaku plohu. Kako na dvije plohe najbliže rafineriji nafte nisu nađeni lišajevi analizirani su uzorci kore.

Transplantirani uzorci analizirani su od strane kolega u Laboratoriju za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut (laboratorij je akreditiranom po EN ISO/IEC 17025:2017), gdje je postojala mogućnost da se analizira veći broj metala, njih 17 (Tablica 3). Uzorci su prvo pripremljeni mikrovalnom razgradnjom u mikrovalnoj pećnici (UltraWAVE ECR MW, Milestone Srl, Italija). Zatim je sadržaj metala u uzorcima analiziran pomoću uređaja Agilent ICP-MS system Model 7900 (Agilent, Palo Alto, CA, SAD) induktivno spregnutom plazmom s masenom spektrometrijom (ICP-MS). Uvjeti na instrumentu i granice detekcije i kvantifikacije navedeni su u prilogu (Prilog 5, Prilog 6). Masa uzorka je bila minimalno 100 mg, a najmanje tri ponavljanja su napravljena za svaku plohu za vrstu *E. prunastri*, dok je radi premalih masa uzorka, bilo moguće napraviti samo jednu repliku *F. caperata* po plohi.

Tablica 3 Vrste metala analizirane u uzorkovanim lišajevima.

Nativni uzorci	Transplantirani uzorci
	Aluminij (Al)
	Arsen (As)
	Bakar (Cu)
	Barij (Ba)
Cink (Zn)	Cink (Zn)
Kadmij (Cd)	Kadmij (Cd)
	Kobalt (Co)
	Krom (Cr)
	Mangan (Mn)
	Molibden (Mo)
Nikal (Ni)	Nikal (Ni)
Olovo (Pb)	Olovo (Pb)
	Selen (Se)
	Srebro (Ag)
	Uranij (U)
	Vanadij (V)
	Željezo (Fe)

3.3. Numerička obrada podataka

Rezultati su analizirani s obzirom na skup podataka, vrstu i vremensku točku, odnosno, posebno su provedene analize za native i transplantirane lišaje, zatim po vrsti te vremenu sakupljanja, s obzirom na transplantaciju. Statistička analiza i vizualizacija provedena je u softverskom paketu Statistica (verzija 14.0), Microsoft Excel (Microsoft Office 365) te programskom jeziku R (verzija 4.4.2; paket: ggplot2). Prostorne analize su provedene u softverskom paketu QGIS (verzija 3.16.11). Ruže vjetrova sam napravila korištenjem objektno orijentiranog programskog jezika Python (verzija 3.8.).

3.3.1. Osnovna statistička obrada podataka

Za native vrste nisu korištene kontrole, odnosno, podaci prikupljeni na udaljenom lokalitetu s pretpostavljenim odsustvom utjecaja rafinerije. Transplantirani su uzorci prije analiza normalizirani s kontrolom, tako da su vrijednosti podijeljene sa srednjom vrijednosti za kontrolu. U slučaju bioakumulacije (nemetali, metali) kao kontrola su korišteni lišajevi prikupljeni prilikom sakupljanja transplantanata na Požeškoj gori. Međutim, za fiziološke parametre, odnosno vitalnost lišajeva te sadržaj sekundarnih metabolita, korišteni su lišajevi prikupljeni na Požeškoj gori u isto vrijeme kada je bilo i sakupljanje tih transplantanata na istraživanim plohama, odnosno nakon tri i sedam mjeseci, kako bi se u obzir uzele prirodne sezonske varijacije koje mogu utjecati na te parametre.

Neparametarski Kruskal-Wallisov test korišten je za testiranje statistički značajnih razlika između grupa uzoraka prikupljenih na različitim istraživačkim plohama za svaki od istraživanih parametara - vitalnost lišajeva: F_v/F_m , q_p , NPQ, R_{Fd} , Chl *a*, Chl *b*, TChl, PQa, Chl *a*/Chl *b*, TCar; sekundarni metaboliti te nemetali N i S i metali Ni, Zn, Cd, Pb i dodatno V kod transplantiranih lišajeva. Kod transplantiranih uzoraka smo uključili V, jer se, uz Ni, smatra pokazateljem industrije izgaranja i/ili rafiniranja nafte (Celo i Dabek-Zlotorzynska, 2010).

Ti su parametri korišteni kao zavisne varijable u daljnjim analizama. Kako bi se smanjio broj zavisnih varijabli vitalnosti lišajeva napravljena je analiza glavnih komponenata (eng. *principal component analysis*, PCA). Ovo je provedeno zajedno s Varimax normaliziranom rotacijom tih komponenata sa svojstvenim vrijednostima (eng. *eigenvalues*) većim od (ili bliskima) jedan (sukladno Preisendorfer i sur., 1981).

U sljedećem koraku, nedostajući podaci zavisnih varijabli popunjeni su prosjekom odgovarajućih varijabli za svaku istraživačku plohu uzorkovanja. Prije izrade regresijskih

modela, provela sam univarijatnu statističku analizu (korelacijska matrica) kako bih promatrala posebne odnose između sadržaja nemetala i metala, četiri glavne komponente vitalnosti lišajeva i sadržaja sekundarnih metabolita.

3.3.2. Izrada regresijskih modela

Za potrebe izrade regresijskih modela u svrhu objašnjenja prostorne varijabilnosti vitalnosti lišajeva i bioakumulacije, definirane su nezavisne varijable kao njihovi potencijalni okolišni prediktori unutar okruženja rafinerije (prikupljene na razini istraživačke plohe, stabla i uzorka). Tako su nezavisne varijable prikupljene za svaku istraživačku plohu uključivale (1) udaljenost plohe od rafinerije nafte, (2) godišnju učestalost vjetera iz smjera rafinerije nafte, i (3) odgovarajuću godišnju prosječnu brzinu vjetera. Nezavisne varijable prikupljene za svako stablo uključivale su samo (4) procjenu gustoće vegetacije oko uzorkovanog stabla. Na kraju, nezavisne varijable prikupljene za svaki nativni uzorak uključivale su (5) relativnu orijentaciju lišajeva na deblu stabla u odnosu na sjever i (6) relativnu orijentaciju lišajeva na deblu stabla u odnosu na smjer rafinerije. Detalji o postupcima uzorkovanja, proračunima i rasponima svih varijabli korištenih u analizi podataka (zavisne i nezavisne) dostupni su u tablici (Prilog 7).

Prvo su izgrađeni regresijski modeli za nativne lišaje. Izgrađena su po dva modela za svaku zavisnu varijablu (četiri glavne komponente za vitalnost lišajeva, kao i sadržaj nemetala i metala te sekundarnih metabolita): za Model A je korištena samo udaljenost od rafinerije nafte kao nezavisna varijabla (jednostavna linearna regresija), dok su za Model B korišteni svi opisani okolišni prediktori kao nezavisne varijable (generalizirani linearni model; GLM). Prilikom izgradnje Modela B, prvo je izgrađen skup svih mogućih GLM-ova sastavljenih u smislu svih mogućih kombinacija (od kojih je jedna i Model A) nezavisnih varijabli (uključujući jednostavne linearne članove i bivarijatne interakcijske linearne članove), da bi se u zadnjem koraku iz tog skupa odabrao (zasebno za svaku zavisnu varijablu) model s optimalnim podskupom nezavisnih varijabli, i to korištenjem Mallows-ove C_p statistike (Mallows, 1973) koji je dalje korišten za konačnu interpretaciju prostornih obrazaca fiziološkog odgovora lišajeva i bioakumulacije zbog onečišćenja zraka u blizini rafinerije nafte.

S obzirom na dobivene rezultate kod nativnih lišajeva koji su pokazali da na području istraživanja i dodatni okolišni faktori (uz udaljenost od rafinerije) imaju značajan utjecaj na prostornu razdiobu bioakumulacije i vitalnosti lišajeva, na transplantiranim lišajevima (obje vrste, vremenska točka T1) je napravljen samo model B, uz korištenje udaljenosti i nezavisnih varijabli povezanih s vjetrom (brzina i čestina). Razlog tome je da su se upravo te varijable

pokazale najznačajnijima u modelu B kod nativnih lišajeva, ali i da su transplantirani lišajevi bili svi usmjereni prema rafineriji na maksimalno izloženom mjestu (što je dokinulo potrebu za korištenjem ostalih nezavisnih varijabli uvrštenim u GLM-ove nad nativnim lišajevima). Bitno je napomenuti kako su za transplantirane lišajeve korišteni podaci iz DHMZ-a za čestinu i prosječnu brzinu vjetra iz smjera rafinerije samo za period izlaganja od tri mjeseca (prosinac 2015. – veljača 2016. godine), dok su za native lišajeve korišteni isti podaci za zadnjih pet godina (2010. – 2014. godina).

3.3.3. Ocjena bioakumulacije metala s kartama distribucije elemenata

Za ocjensko klasiranje bioakumulacije metala u ovom radu koristila sam interpretativnu skalu za bioakumulaciju metala u lišajevima koju su izradili Cecconi i sur. (2019), uzevši u obzir velik set postojećih podataka i to zasebno za native i transplantirane lišaje. Za native lišajeve skala je definirana odvojeno za svaku od dvije najčešće vrste lišajeva *Xanthoria parietina* i *Flavoparmelia caperata*, koje se najčešće koriste kao native lišajevi u istraživanjima bioakumulacije metala, a za koje su utvrđene razlike u bioakumulaciji. Kako bismo dobili vrijednosti usporedive sa postojećom skalom (tzv. B omjer), srednje vrijednosti koncentracije metala po istraživačkoj plohi podijeljene su s literaturnim podacima za pozadinske vrijednosti koncentracija pojedinih elemenata (BEC; µg/g suhe tvari) za vrstu *F. caperata*: Ni (1,27), Zn (35,3), Cd (0,18) i Pb (2,37). Na temelju dobivene vrijednosti B omjera svakoj plohi je pridružena određena bioakumulacijska klasa (Tablica 4).

Tablica 4 Bioakumulacijske klase za metale u nativnim lišajevima (B omjer) i transplantiranim lišajevima, na temelju izloženosti od 12 tjedana (EU omjer) (prilagođeno prema Cecconi i sur., 2019).

Bioakumulacijska klasa	B omjer	EU omjer	Kôd boje (HTML)
(A) Odsutnost bioakumulacije	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	#0000FF (plava)
(L) Niska bioakumulacija	(1,0; 2,1]	(1,0; 1,8]	#008000 (tamno zelena)
(M) Umjerena bioakumulacija	(2,1; 3,4]	(1,8; 3,1]	#FFF30F (žuta)
(H) Visoka bioakumulacija	(3,4; 4,9]	(3,1; 3,7]	#FF0000 (crvena)
(S) Vrlo visoka bioakumulacija	$> 4,9$	$> 3,7$	#800040 (tamno magenta)

S druge strane, za određivanje razine bioakumulacije za metale u transplantiranim lišajevima koristi se omjer koncentracije izmjerene u izloženim lišajevima u odnosu na one u neizloženim lišajevima (EU omjer, eng. *exposed-to-unexposed ratio*; *EU ratio*). Ista skala vrijedi za sve vrste lišajeva, iako se, kako je navedeno u uvodu, za ovakva istraživanja prvenstveno koriste grmaste vrste *E. prunastri* i *P. furfuracea*. U literaturi postoje vrijednosti za tri vremena izlaganja, četiri, osam i dvanaest tjedana (Cecconi i sur., 2019), jer se očekuju veće koncentracije s vremenom izlaganja. S obzirom na primijenjenu duljinu izlaganja u ovom radu

(tri i sedam mjeseci, odnosno, 12 i 28 tjedana) koristila sam vrijednosti od 12 tjedana izlaganja kako bih odredila bioakumulacijsku klasu za pojedinu plohu (Tablica 4). Razina bioakumulacije je određena za sve analizirane metale u transplantiranim lišajevima.

U cilju prostornog prikaza distribucije bioakumuliranih onečišćujućih tvari napravila sam karte distribucije, odnosno zasebne karte za svaki od analiziranih metala prema skali razvijenoj od strane Cecconi i sur. (2019). Za prostorni prikaz bioakumulacije u nativnim lišajevima *F. caperata* izradila sam karte za metale Ni, Zn, Cd i Pb, a plohe na kojima lišajevi nisu pronađeni (tzv. „lišajna pustinja“) označila sam bijelom bojom. Za bioakumulaciju u transplantiranim lišajevima koristila sam rezultate samo za vrstu *E. prunastri* u prvoj vremenskoj točki (T1), odnosno nakon tri mjeseca izlaganja, iz sljedećih razloga: (1) zbog veće veličine uzorka i količine prikupljenog materijala za vrstu *E. prunastri*, kao i njene češće upotrebe u literaturi, (2) zima je period s najvišim onečišćenjem zraka u Slavonskom Brodu, što je rezultiralo značajnom bioakumulacijom već u prvom periodu, a i uobičajeno trajanje eksperimenata s transplantatima iznosi tri mjeseca.

Također su izrađene slične karte distribucije za nemetale (N i S) za native lišajeve *F. caperata* i transplantirane lišajeve *E. prunastri* (T1), iako za nemetale ne postoji unaprijed definirana referentna skala. Stoga je interval izmjerenih vrijednosti za njih podijeljen u pet jednakih kvantila (eng. *Equal Count (Quantile)*) u ljestvici jedne boje (zelene za N, crvene za S).

4. REZULTATI

4.1. Nativni lišajevi

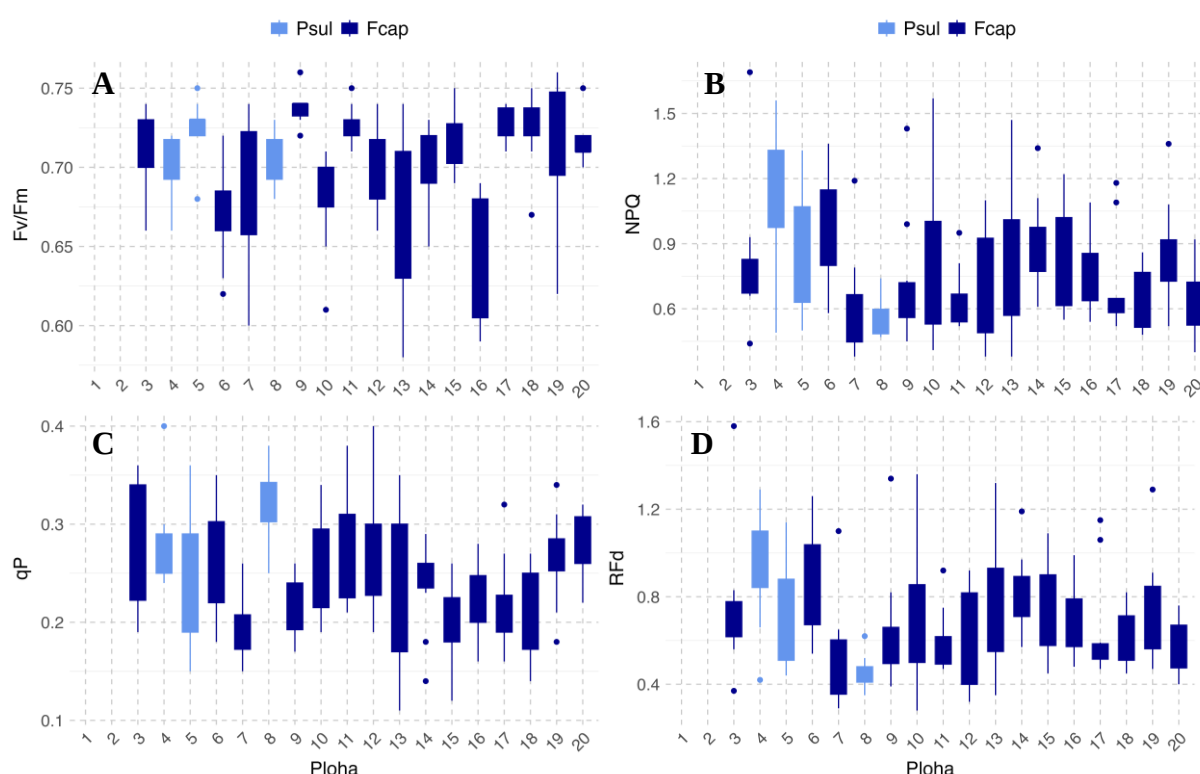
Nativni lišajevi nisu pronađeni na dvije plohe najbliže rafineriji (< 2 km), što ukazuje na „lišajnu pustinju“ s visokim razinama onečišćenja zraka (Slika 12). Na preostalih 18 ploha, vrsta *Flavoparmelia caperata* pronađena je u dovoljnoj količini za ovo istraživanje na 15 ploha, dok na ploham 4, 5 i 8 ta vrsta nije bila pronađena ili nije bila dostupna u dovoljnom broju, pa je umjesto nje uzorkovana vrsta *P. sulcata*. Iako je riječ je o morfološki jako sličnoj vrsti, moguće su interspecijske razlike u bioakumulaciji i fiziološkom odgovoru organizama na onečišćenje. Stoga su podaci za vrstu *P. sulcata* prikazani i kvalitativno analizirani, ali su daljnje analize, poput ocjenjivanje klase bioakumulacije metala, korelacija između varijabli, PCA i GLM, provedene samo na podacima s ploha koje sadrže vrstu *F. caperata*, odnosno, isključujući plohe 1, 2 („lišajna pustinja“) te 4, 5 i 8.



Slika 12 Fotografije prikazuju „lišajnu pustinju“ (A), native uzorke lišaja *Flavoparmelia caperata* (B) i *Parmelia sulcata* (C) na istraživanim ploham na području Slavonskog Broda (autor: Maja Maslač Mikulec).

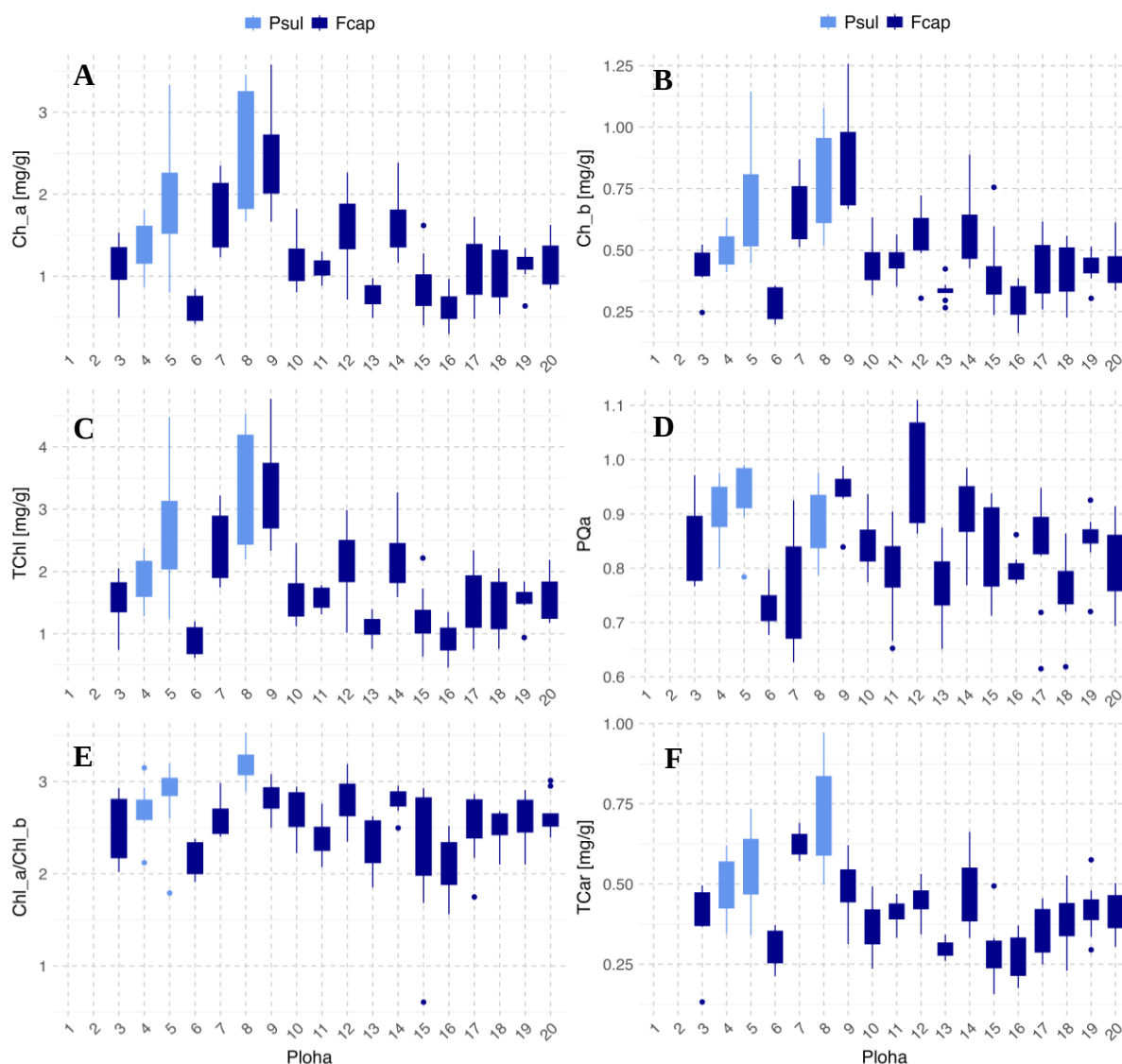
4.1.1. Vitalnost nativnih lišajeva

Zbog lakše usporedbe slike prikazuju podatke za obje vrste zajedno, a prvo su prikazani parametri fluorescencije klorofila (Slika 13). Većina vrijednosti F_v/F_m nalazi se u rasponu od 0,7 do 0,75, dok su najniže vrijednosti zabilježene u lišajevima skupljenim na ploham 6 i 16. NPQ vrijednosti su najviše u lišajevima s ploha 4-6, a najniže s ploha 7 i 8. Najniže vrijednosti q_P zabilježene su u lišajevima na ploham 7, 9 i 15, a najviše na plohi 8. Omjer R_{Fd} je najviši u lišajevima s ploha 4, 5 i 6, dok je najniži s ploha 7 i 8.



Slika 13 Box-Whisker dijagrami prikazuju parametre fluorescencije klorofila a u nativnim uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata* i *Parmelia sulcata*: F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije (A), NPQ - nefotokemijsko gašenje (B), q_P - fotokemijsko gašenje (C), R_{Fd} - omjer smanjenja fluorescencije (D). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. Na prve dvije plohe nije bilo lišajeva („lišajna pustinja“). „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ - minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke - vrijednosti veće od 1,5 IQR.

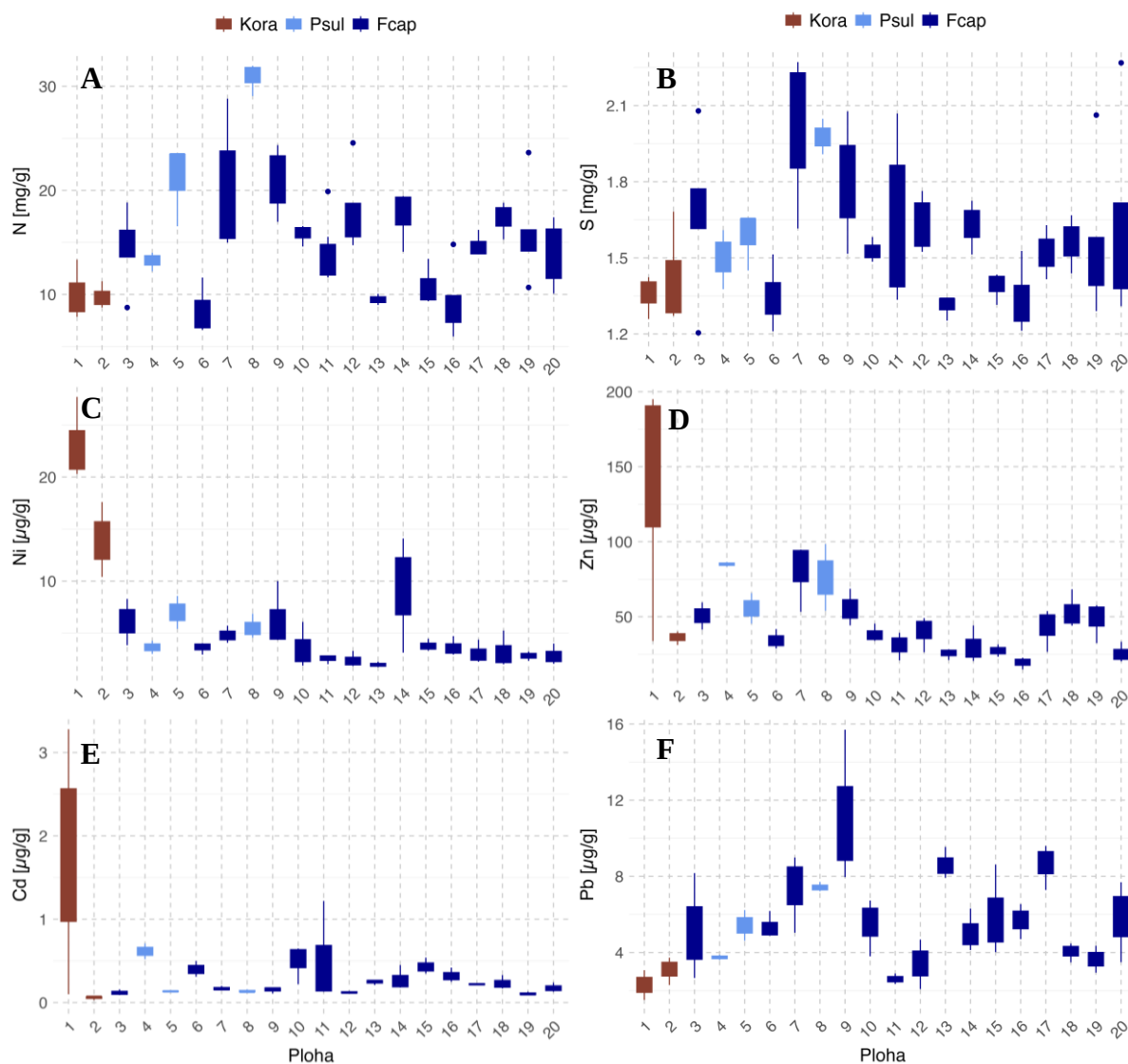
Vrijednosti fotosintetskih pigmenata (Slika 14), pokazuju kako su najviše vrijednosti izmjerene za Chl *a*, Chl *b*, TChl, TCar u lišajevima uzorkovanim na ploham 5 te 7-9, dok oni s ploha 6 i 15-16 imaju najniže vrijednosti. Omjer Chl *a*/Chl *b* je najviši u lišajevima s ploha 5, 8, 9 i 12. Vrijednosti PQa su ispod 1,1 za sve mjerene uzorke, ali je posebno niska vrijednost zabilježena u lišajevima na ploham 6 i 7.



Slika 14 Box-Whisker dijagrami prikazuju fotosintetske pigmente u nativnim uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata* i *Parmelia sulcata*: pigmenti u mg/g suhe tvari (A, Chl *a* - klorofil *a*; B, Chl *b* - klorofil *b*; C, TChl – ukupni klorofil; F, TCar – ukupni karotenoidi) i bez mjerne jedinice (D, PQa - kvocijent feofitinizacije; E, Chl *a*/Chl *b* – omjer Chl *a* i Chl *b*). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. Na prve dvije plohe nije bilo lišajeva („lišajna pustinja“). „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

4.1.2. Bioakumulacija elemenata u nativnim lišajevima

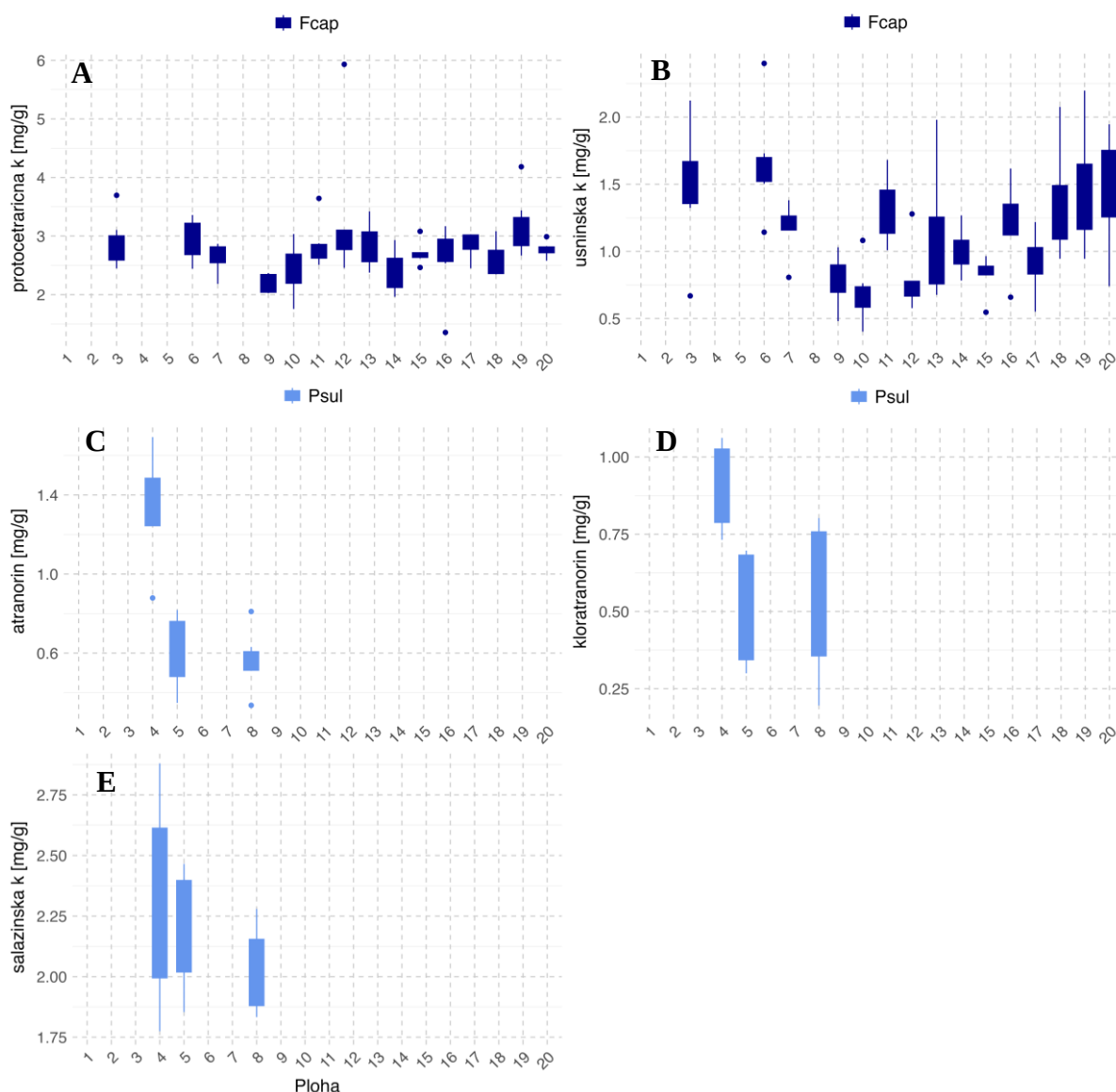
Sadržaj metala (Ni, Zn, Pb i Cd) i nemetala (N i S) je mjereno u kori na plohama gdje nisu nađeni lišajevi te u obje vrste lišajeva, ovisno koji je nađen na kojoj plohi (Slika 15). Kora je pokazala niže vrijednosti za nemetale od lišajeva. Najviše vrijednosti za nemetale u lišajevima su zabilježene na plohama 7-9, dok se s visokim sadržajem N ističe i ploha 5. Najniže su vrijednosti nemetala izmjerene u lišajevima na plohama 6, 13 i 16. Za tri su metala (Ni, Zn i Cd) značajno više vrijednosti izmjerene u kori spram lišajeva, a posebno se ističe ploha 1. S druge strane, Pb ima niske vrijednosti u kori spram onih zabilježenih u lišajevima. Za Ni kod lišajeva najviše vrijednosti su na plohama 3, 5, 7-9 te 14, dok su za Zn na 4, 7 i 8. Najviše vrijednosti Cd su zabilježene na plohama 4, 6, 10 i 11, a za Pb na plohama 9, 13 i 17.



Slika 15 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj nemetala i metala u nativnim uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata* i *Parmelia sulcata* te kori: N – dušik (A), S – sumpor (B) u mg/g; Ni – nikal (C), Zn – cink (D), Cd – kadmij (E), Pb – olovo (F) u µg/g suhe tvari. Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ – interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

4.1.3. Sekundarni metaboliti u nativnim lišajevima

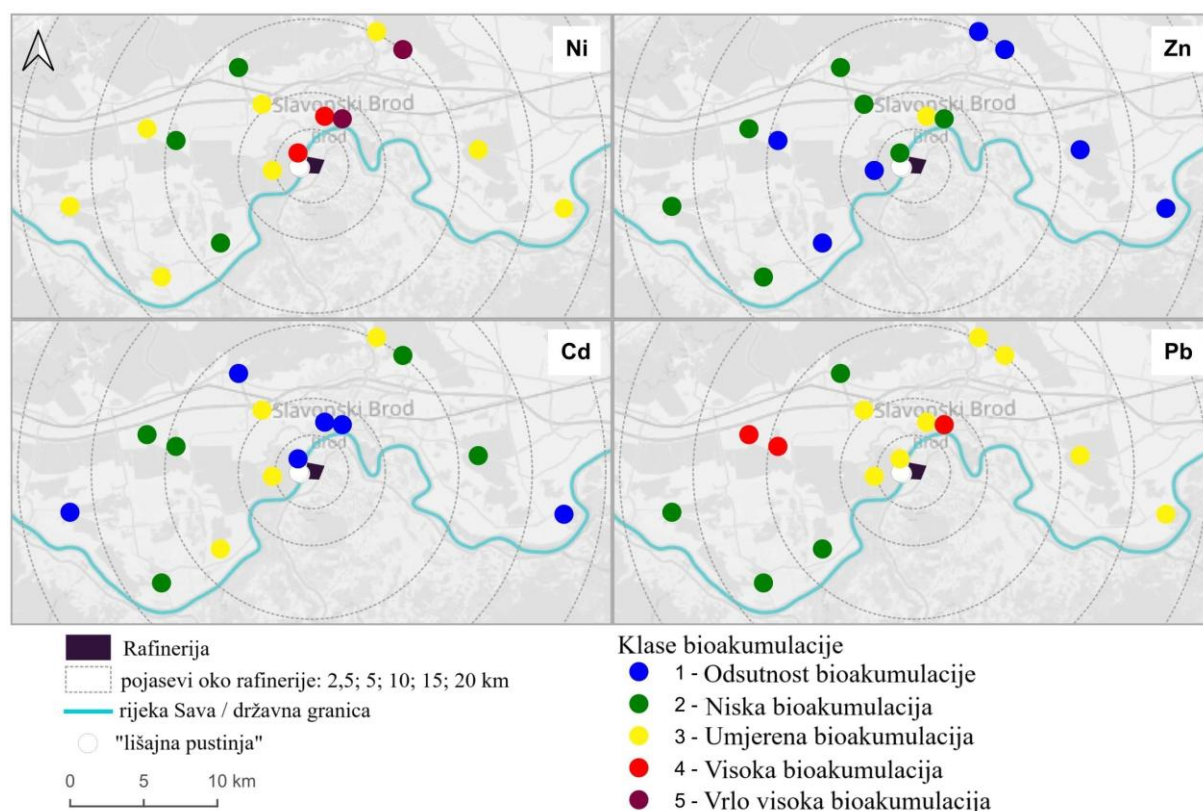
Sekundarni metaboliti se razlikuju za različite vrste, stoga su prikazani odvojeno (Slika 16). U slučaju sekundarnih metabolita prisutnih u uzorcima *F. caperata*, vrijednosti za protocetraričnu i usninsku kiselinu su najniže u lišajevima s plohe 9 i 10, s time da se kod usninske kiseline ističu najviše vrijednosti u lišajevima na ploham 3 i 6. Za sekundarne metabolite prisutne u uzorcima *P. sulcata*, lišajevi na plohi 4 imaju približno dvostruko više koncentracije atranorina i kloratranorina od lišajeva na druge dvije plohe (5 i 8), dok je koncentracija salazinske kiseline nešto snižena u lišajevima na plohi 8.



Slika 16 Box-Whisker dijagrami prikazuju koncentracije sekundarnih metabolita u mg/g u nativnim uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata* (protocetrarična i usninska kiselina) i *Parmelia sulcata* (atranorin, kloratranorin i salazinska kiselina). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. Na prve dvije plohe nije bilo lišajeva („lišajna pustinja“). „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

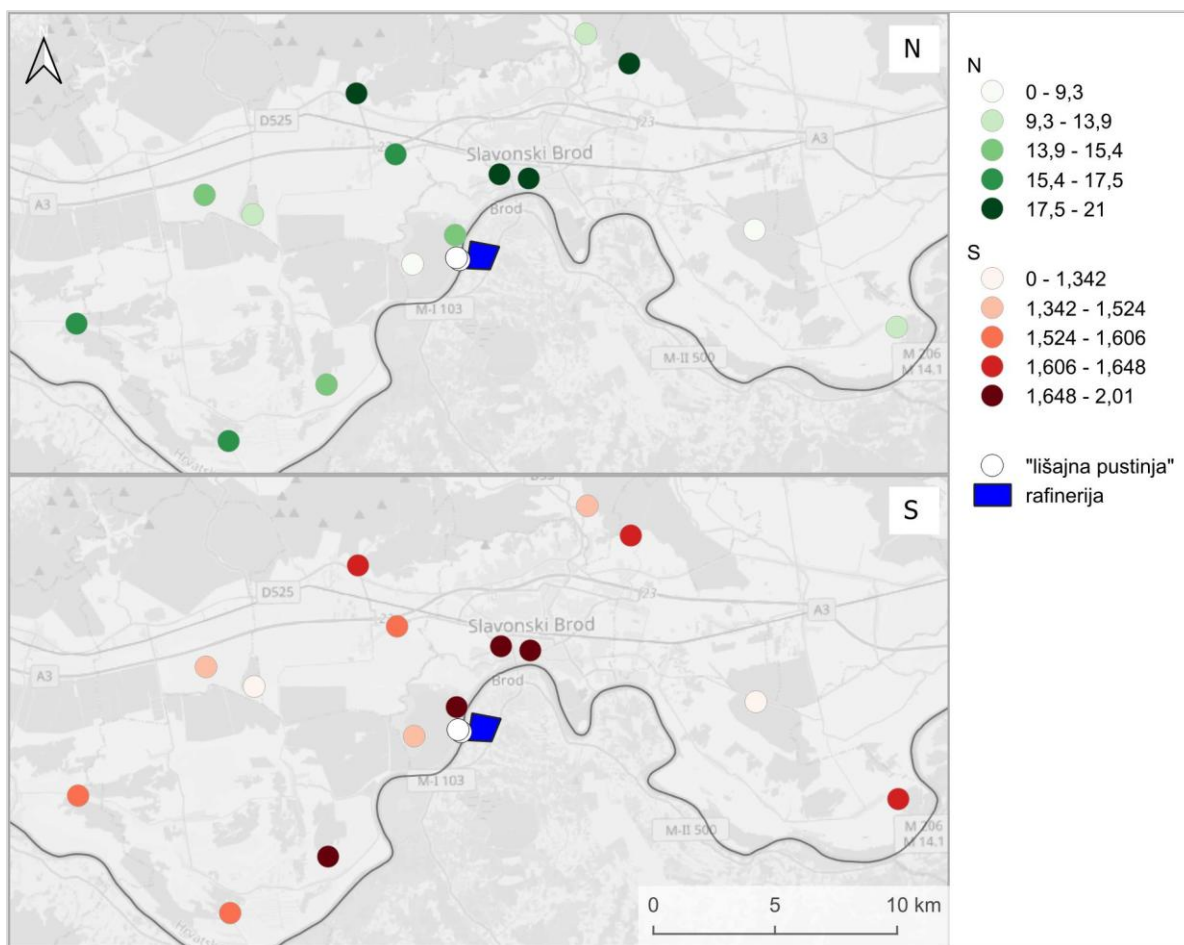
4.1.4. Karte distribucije bioakumuliranih elemenata u nativnim lišajevima

Prema klasama bioakumulacije metala u jedinkama vrste *F. caperata* (Cecconi i sur., 2019), utvrđena je „vrlo visoka bioakumulacija“ za Ni, dok je za Pb zabilježena „visoka bioakumulacija“, a Cd i Zn su pokazali „umjerenu bioakumulaciju“ (Slika 17). Bioakumulacija metala nije pokazala jasnu povezanost s udaljenošću od rafinerije nafte, ali su se pojavili različiti obrasci – „vrlo visoka“ i „visoka bioakumulacija“ Ni u sjeveroistočnom smjeru, do 10 km od rafinerije, i „visoka bioakumulacija“ Pb na dvije plohe udaljene oko 10 km od rafinerije, ali u zapadnom smjeru. Također se može primijetiti da je na plohi 7, koja se nalazi uz službenu mjernu postaju, Zn jedini metal koji pokazuje najvišu razinu bioakumulacije, dok drugi teški metali dosižu najviše vrijednosti bioakumulacije na drugim plohama.



Slika 17 Ocjenske klase bioakumulacije za nikal (Ni), cink (Zn), kadmij (Cd) i olovo (Pb) u nativnim uzorcima *Flavoparmelia caperata* na istraživanim plohama (klasirano prema Cecconi i sur. (2019)). Na dvije plohe najbliže rafineriji nisu pronađeni lišajevi („lišajna pustinja“). Pozadinska karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.

Kod bioakumulacije nemetala (S, N) vidljivo je kako su najviše vrijednosti na plohama u Slavonskom Brodu (plohe 7 i 9) (Slika 18). Najviše vrijednosti za S se dodatno ističu za plohu 3 (najbliža ploha koja je imala lišajeve) te plohu 13 (u jugozapadnom smjeru od rafinerije), a za N plohe 12 i 14, na podnožju Dilj gore. Ploha 16 je za oba elementa imala najniže vrijednosti, a među onima s najnižim vrijednostima su i plohe 13 i 6.



Slika 18 Vrijednosti koncentracija za dušik (N) i sumpor (S) u mg/g suhe tvari, izmjerene u nativnim uzorcima *Flavoparmelia caperata*, prikazane kao pet klasa u jednakim kvantilima. Na dvije plohe najbliže rafineriji nisu pronađeni lišajevi („lišajna pustinja“). Pozadinska karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.

4.1.5. Usporedba rezultata između ploha za native lišajeve

Za 15 istraživačkih ploha na kojima su nađeni lišajevi vrste *Flavoparmelia caperata* analizirala sam postoje li statistički značajne razlike između ploha za svaki od istraživanih parametara - vitalnost lišajeva: F_v/F_m , q_p , NPQ, R_{Fd} , Chl *a*, Chl *b*, TChl, PQa, Chl *a*/Chl *b*, TCar; sekundarni metaboliti (protocetrarična i usninska kiselina) te nemetali N i S i metali Ni, Zn, Cd, Pb. Rezultati Kruskal-Wallis testova pokazuju statistički značajne razlike (pri razini vjerojatnosti $p = 0,05$ ili strožoj) među plohami za sve parametre (Tablica 5). Iako niti jedan od parametara nije pokazao jasnu korelaciju s udaljenošću od rafinerije nafte, neki potencijalni obrasci su se ipak pojavili (Tablica 5). Na primjer, gotovo svi mjereni parametri ostvarili su značajno više (F_v/F_m , pigmenti, sadržaj N, S, Zn i Pb) ili niže (q_p , NPQ, R_{Fd} , protocetrarična kiselina) vrijednosti u lišajevima sakupljenima na plohami 7 i/ili 9, dok je na istraživačkoj plohi 6 bilo suprotno. Ovo opažanje upućuje na postojanje i drugih faktora (osim udaljenosti do rafinerije) koji utječu na razinu imisije štetnih tvari u prostoru, kao i posljedično na prostornu varijabilnost fiziološkog odgovora lišajeva na tu imisiju.

Tablica 5 Vrijednosti zavisnih varijabli u uzorkovanim nativnim lišajevima *Flavoparmelia caperata* po istraživačkoj plohi (srednja vrijednost; obojano prema varijablama na skali boja – najviša brojka je tamnije boje, bijela je najniža): parametri fluorescencije klorofila a (F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije, NPQ - nefotokemijsko gašenje, q_p - fotokemijsko gašenje, R_{Fd} - omjer smanjenja fluorescencije); pigmenti u mg/g suhe tvari (Chl a - klorofil a, Chl b - klorofil b, TChl – ukupni klorofil, TCar – ukupni karotenoidi) i bez mjerne jedinice (PQa - kvocijent feofitinizacije); sadržaj nemetala (S – sumpor, N – dušik) u mg/g; sadržaj metala (Ni – nikal, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo) u $\mu\text{g/g}$ suhe tvari, sekundarnih metabolita (P.kis. – protocetrarična kiselina, U.kis. – usninska kiselina) u mg/g suhe tvari. Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. Na plohama najbližim rafineriji (1 i 2) nisu nađeni lišajevi, dok na plohama 4,5 i 8 nije bilo *F. caperata* ili nije bilo dovoljno materijala. H – Kruskal-Wallis statistika; $p(H)$ - vjerojatnost Kruskal-Wallis statistika, N - veličina uzorka (broj uzorkovanih lišajeva).

Ploha	F_v/F_m	q_p	NPQ	R_{Fd}	Chl a	Chl b	TChl	PQa	Chl a/ Chl b	TCar	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	P.kis.	U.kis.
3	0,71	0,28	0,82	0,76	1,09	0,43	1,52	0,84	2,47	0,4	14,62	1,66	6,12	50,6	0,12	5,15	2,86	1,48
6	0,67	0,26	0,92	0,84	0,62	0,29	0,9	0,73	2,15	0,31	8,44	1,35	3,61	34,43	0,4	5,34	2,92	1,66
7	0,69	0,19	0,61	0,52	1,74	0,66	2,40	0,75	2,60	0,62	21,04	2,01	4,82	80,50	0,17	7,34	2,62	1,17
9	0,74	0,22	0,71	0,64	2,41	0,86	3,27	0,94	2,81	0,49	20,92	1,8	6,28	55,6	0,15	11,13	2,18	0,79
10	0,68	0,26	0,83	0,7	1,16	0,44	1,6	0,84	2,64	0,36	15,81	1,53	3,54	38,37	0,5	5,48	2,47	0,69
11	0,73	0,27	0,64	0,6	1,1	0,46	1,56	0,79	2,41	0,41	13,97	1,65	2,54	30,83	0,5	2,61	2,85	1,32
12	0,7	0,27	0,71	0,61	1,56	0,55	2,11	0,97	2,81	0,44	17,98	1,64	2,4	40	0,12	3,41	3,42	0,80
13	0,67	0,23	0,87	0,8	0,78	0,34	1,12	0,77	2,32	0,3	9,5	1,31	1,97	25,47	0,25	8,62	2,81	1,09
14	0,7	0,24	0,91	0,82	1,64	0,59	2,23	0,91	2,79	0,49	17,6	1,63	9,21	30,1	0,28	5,05	2,35	1,00
15	0,72	0,2	0,85	0,76	0,88	0,41	1,29	0,83	2,29	0,29	10,79	1,39	3,8	27,37	0,43	5,91	2,71	0,82
16	0,65	0,22	0,78	0,72	0,63	0,3	0,93	0,8	2,09	0,28	9,19	1,34	3,63	19,37	0,32	5,68	2,60	1,19
17	0,73	0,22	0,71	0,65	1,1	0,42	1,52	0,84	2,52	0,35	14,67	1,52	3,06	43	0,22	8,62	2,86	0,91
18	0,73	0,21	0,66	0,63	1,06	0,42	1,48	0,76	2,49	0,38	17,31	1,56	3,2	53,3	0,23	4,04	2,65	1,37
19	0,71	0,26	0,84	0,76	1,13	0,43	1,56	0,85	2,6	0,42	15,97	1,57	2,81	48,4	0,11	3,65	3,15	1,45
20	0,72	0,28	0,63	0,58	1,19	0,45	1,64	0,82	2,64	0,42	13,86	1,63	2,85	25,5	0,18	5,79	2,77	1,48
H	66,45	41,78	25,63	27,07	82,03	75,49	82,29	61,08	53,22	71,16	35,84	27,31	25,21	30,92	32,09	31,19	24,06	42,24
$p(H)$	0,0000	0,0001	0,0288	0,0189	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0175	0,0326	0,0057	0,0039	0,0052	0,0451	0,0001
N	149	149	149	149	136	136	136	136	136	136	59	59	45	45	45	45	84	84

4.1.6. Univarijatna korelacija zavisnih varijabli za native lišajeve

Skup varijabli vitalnosti lišajeva smanjen je pomoću analize glavnih komponenti (PCA) na četiri glavne komponente, a sve bliske korelacije bile su pozitivne. One su objasnile 85,8 % ukupne varijabilnosti, pri čemu prva komponenta (F1; 36,2 % ukupne varijance) predstavlja sve varijable vezane uz pigmente (TChl, PQa, TCar, Chl *a*/Chl *b*), druga (F2; 24,8 %) predstavlja NPQ i R_{Fd} , treća (F3; 12,9 %) predstavlja q_p , a četvrta (F4; 11,8 %) predstavlja F_v/F_m (Prilog 8).

Nakon što je analiza glavnih komponenti (PCA) smanjila broj zavisnih varijabli povezanih s vitalnošću lišajeva, generirana je matrica univarijantnih korelacija između svih zavisnih varijabli (povezanih kako s vitalnošću, tako i s bioakumulacijom i sadržajem sekundarnih metabolita). Ova matrica je pokazala postojanje pozitivnih korelacija između varijabli N, S, Ni, Zn i F1 (Tablica 6). Cd je pokazao negativne korelacije s N, S, Zn i F1. Faktor F1, koji predstavlja sve varijable povezane s fotosintetskim pigmentima, pokazao je pozitivne korelacije s nemetalima i raznim metalima, što je u skladu s ranije prikazanim (Tablica 5), gdje su ove varijable pokazale najviše koncentracije na istim plohama. Nasuprot tome, F2, koji predstavlja NPQ i R_{Fd} , pokazao je negativnu korelaciju sa S i pozitivnu korelaciju s Ni. Faktor F3, koji predstavlja q_p , bio je negativno koreliran s N, S, Zn i Pb. Na kraju, F4, koji označava F_v/F_m , pokazao je pozitivnu korelaciju samo s N. S obzirom na sekundarne metabolite, protocetrarična kiselina je pokazala negativnu korelaciju s Ni, Cd, Pb te pozitivnu s F3 i usninskom kiselinom, koja ima negativne korelacije s N, Pb i F1. Četiri glavne komponente vezane uz vitalnost lišajeva nisu pokazale međusobne korelacije, što je i očekivano, s obzirom da potječu iz PCA analize koja uzima u obzir koreliranost među varijablama.

Tablica 6 Pearsonovi korelacijski koeficijenti između sadržaja N, S, Ni, Zn, Cd, Pb, faktora vitalnosti i sekundarnih metabolita lišajeva. Podebljano označava $p < 0,05$.

	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	F1	F2	F3	F4	P.kis.	U.kis.
N	1,000											
S	0,795	1,000										
Ni	0,303	0,281	1,000									
Zn	0,650	0,611	0,145	1,000								
Cd	-0,310	-0,190	-0,023	-0,280	1,000							
Pb	0,100	0,099	0,223	0,180	-0,121	1,000						
F1	0,645	0,518	0,354	0,344	-0,328	0,158	1,000					
F2	-0,130	-0,171	0,172	-0,131	0,060	0,050	0,000	1,000				
F3	-0,203	-0,180	-0,094	-0,327	0,069	-0,304	0,000	0,000	1,000			
F4	0,165	0,030	-0,089	0,041	-0,100	-0,047	0,000	0,000	0,000	1,000		
P.kis.	-0,119	-0,115	-0,330	-0,037	-0,201	-0,272	-0,088	-0,093	0,227	0,011	1,000	
U.kis.	-0,220	-0,064	-0,094	0,052	-0,133	-0,235	-0,323	-0,066	0,082	-0,069	0,407	1,000

N—dušik; S—sumpor; Ni—nikal; Zn—cink; Cd—kadmij; Pb—olovo; F1, F2, F3, F4—četiri glavne komponente vitalnosti lišajeva; P.kis. – protocetrarična kiselina, U.kis. – usninska kiselina

4.1.7. Regresijski modeli za *nativne lišajeve*

Razvijena su dva regresijska modela kako bi se procijenio utjecaj različitih prediktora na vitalnost lišajeva i bioakumulaciju. Model A (univarijatna linearna regresija) koristi samo udaljenost od rafinerije kao linearni prediktor, dok Model B (generalizirani linearni model; GLM) uključuje optimiziranu linearnu kombinaciju šest okolišnih parametara i njihovih uzajamnih interakcija (umnožaka) prvog reda (Tablica 7), pri čemu su oba modela primijenjena na svaku zavisnu varijablu. Rezultati pokazuju da sama udaljenost objašnjava značajno manje varijabilnosti svake zavisne varijable u usporedbi s modelom koji uključuje više okolišnih procjenitelja (Slika 19). To sugerira da dodatni okolišni faktori igraju značajnu ulogu u utjecaju na koncentracije nemetala i metala u lišajevima, kao i na ukupnu vitalnost lišajeva i sekundarne metabolite.

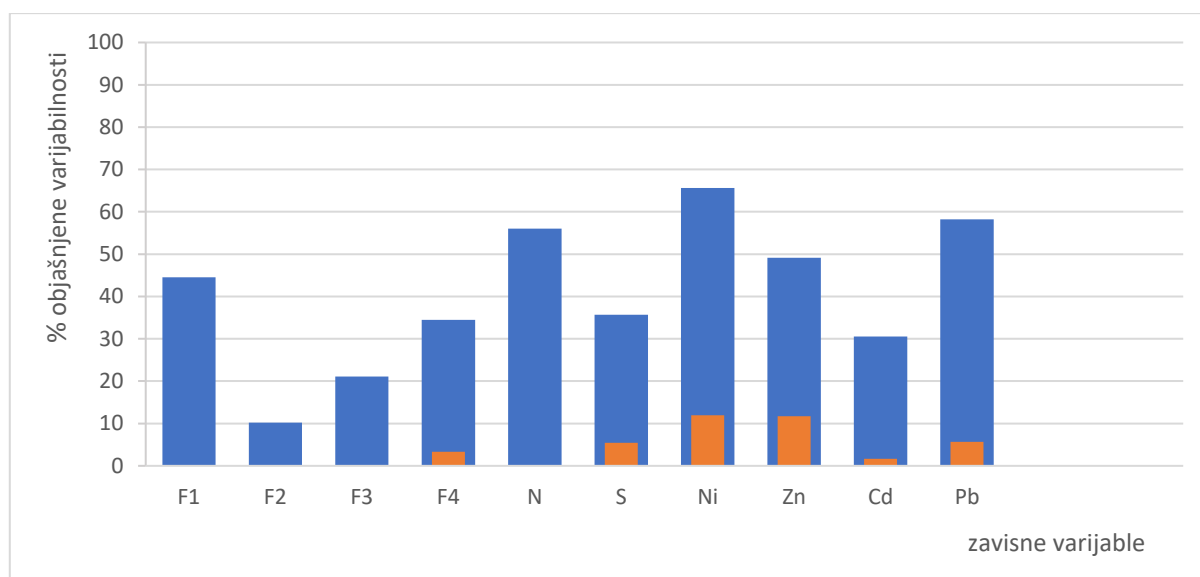
Analizirajući okolišne parametre kao nezavisne linearne varijable u modelima (bez razmatranja interakcijskih varijabli), udaljenost od rafinerije bila je, očekivano, negativno korelirana s većinom varijabli u oba modela. Jedine pozitivne korelacije zabilježene su u Modelu A za F3 i F4 te sekundarne metabolite, gdje je samo za F4 bilo značajno objašnjenje modela ($p < 0,05$). S druge strane, u Modelu B pozitivna korelacija je zabilježena za udaljenost od rafinerije i Cd te protocetraričnu kiselinu. Učestalost vjetra imala je pozitivnu korelaciju sa S, F1, F2 i Ni, dok je negativno korelirala s F4 i Pb, dok je brzina vjetra bila negativno korelirana s F3 i Ni, a pozitivno s Zn i Pb. Orijentacija lišajeva na deblu u odnosu na rafineriju imala je negativnu korelaciju s F3 (poput udaljenosti i brzine vjetra) i oba sekundarna metabolita, te pozitivnu s Zn i Cd. Gustoća vegetacije imala je samo negativnu korelaciju s Pb. Orijentacija lišajeva na deblu u odnosu na sjever, kada je uzeta kao nezavisni prediktor, imala je samo pozitivnu korelaciju s usninskom kiselinom.

Među šest okolišnih parametara uključenih u Model B, udaljenost od rafinerije se kao nezavisna varijabla (bilo samostalna, bilo u interakcijama) pojavila ukupno 27 puta (za sve zavisne varijable) kao statistički značajan procjenitelj. Brzina i učestalost vjetra specifična za smjer također su bili značajni prediktori, s 27 i 19 značajnih doprinosa, dok su za orijentaciju lišajeva na stablu u odnosu na rafineriju i pravi sjever, zajedno s gustoćom vegetacije, zabilježeni doprinosi 17, 4 i 17.

Tablica 7 Rezultati optimiziranih generaliziranih linearnih modela (GLM) koji objašnjavaju faktore vitalnosti lišajeva (vidi Prilog 7) i sadržaj nemetala (S, N) i metala (Ni, Zn, Cd, Pb) i sekundarnih metabolita (P.kis. – protocetrarična kiselina, U.kis. – usninska kiselina), kao funkciju različitih okolišnih prediktora: Model A—jedini parametar je udaljenost između rafinerije i plohe; Model B—korišteno je šest okolišnih parametara. Parametri (ili kombinacija parametara) koji nisu imali značajan učinak na varijable napisani su koso. Značajni odnosi prikazani su podebljano.

MODEL		F1	F2	F3	F4	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	P.kis.	U.kis.
A	R ²	0,01	0,00	0,01	0,03	0,01	0,05	0,12	0,12	0,02	0,06	0,01	0,01
	F	2,17	1,09	3,32	7,53	2,44	11,93	26,89	26,38	4,26	12,55	2,91	3,00
	p (F)	0,14	0,30	0,07	0,01	0,12	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,09	0,08
	GLM konstanta	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
	d_ref	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+
B	R ²	0,45	0,10	0,21	0,34	0,56	0,36	0,66	0,49	0,31	0,58	0,22	0,46
	F	26,57	8,21	9,52	17,76	41,62	18,64	61,81	31,72	15,01	45,40	11,87	28,18
	p (F)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	GLM konstanta	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
	d_ref	–	n.s.	–	n.s.	–	–	–	n.s.	+	n.s.	+	–
	v_den	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.
	a_ref	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	n.s.	–	–
	a_north	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+
	w_frq	+	+	n.s.	–	n.s.	+	+	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.
	w_spd	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.	–	+	n.s.	+	n.s.	n.s.
	d_ref*v_den	+	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	n.s.	+	–	+	n.s.	n.s.
	d_ref*a_ref	n.s.	n.s.	n.s.	+	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	+
	v_den*a_ref	n.s.	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	d_ref*a_north	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	v_den*a_north	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	–
	a_ref*a_north	n.s.	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	d_ref*w_frq	n.s.	n.s.	–	n.s.	+	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	n.s.
	v_den*w_frq	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	a_ref*w_frq	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	a_north*w_frq	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	d_ref*w_spd	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	+	–	n.s.	–	–	n.s.
	v_den*w_spd	–	n.s.	n.s.	–	–	–	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	+
	a_ref*w_spd	+	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	n.s.	n.s.	–	n.s.	+	n.s.
	a_north*w_spd	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.
	w_frq*w_spd	–	–	+	n.s.	n.s.	–	–	–	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Nezavisne varijable korištene u analizi kao procjenitelji prostornog rasporeda onečišćenja iz rafinerije (uključujući bivarijantne interakcije): (1) udaljenost od istraživačke plohe do rafinerije (d_ref), (2) učestalost vjetra koji dolazi iz smjera rafinerije (w_frq), (3) srednja brzina vjetra iz smjera rafinerije (w_spd), (4) procjena gustoće vegetacije oko uzorkovanog stabla (v_den), (5) relativna orijentacija lišajeva na stablu u odnosu na sjever (a_north), (6) relativna orijentacija lišajeva na stablu u odnosu na smjer rafinerije (a_ref). N—sadržaj dušika; S—sadržaj sumpora; F1, F2, F3, F4—četiri glavne komponente vitalnosti lišajeva; Ni – sadržaj nikala; Zn – sadržaj cinka; Cd – sadržaj kadmija; Pb – sadržaj olova; sadržaj sekundarnih metabolita (P.kis. – protocetrarična kiselina, U.kis. – usninska kiselina); R²—koeficijent determinacije; F—proporcija objašnjene i neobjašnjene varijabilnosti (F—statistika); p (F)—vjerojatnost F—statistike; n.s.—nema značajnosti; plus (+) označava značajnu pozitivnu korelaciju; minus (–) označava značajnu negativnu korelaciju. Prikazane su samo nezavisne varijable koje su bile značajni procjenitelji (na razini vjerojatnosti p = 0,05) za barem jednu zavisnu varijablu.



Slika 19 Usporedba prediktivne moći dva generalizirana linearna modela (GLM), od kojih je jedan napravljen s udaljenošću kao jedinim prediktorom (Model A; narančasta), a drugi s kombinacijom 6 okolišnih prediktora (Model B; plava).

4.2. Transplantirani lišajevi

Prilikom čišćenja uzoraka već su u prvoj vremenskoj točki (T1) zapažena oštećenja na nekim od uzoraka, prvenstveno na plohi 1 i 2 (plohe najbliže rafineriji), i to u obliku diskoloracije, što je zabilježeno i u drugoj vremenskoj točki (T2) (Slika 20, Slika 21).



Slika 20 Oštećenja u obliku diskoloracije na transplantiranom lišaju *Flavoparmelia caperata* na plohi 1 (ploha najbliža rafineriji) nakon 3 mjeseca izlaganja (T1).

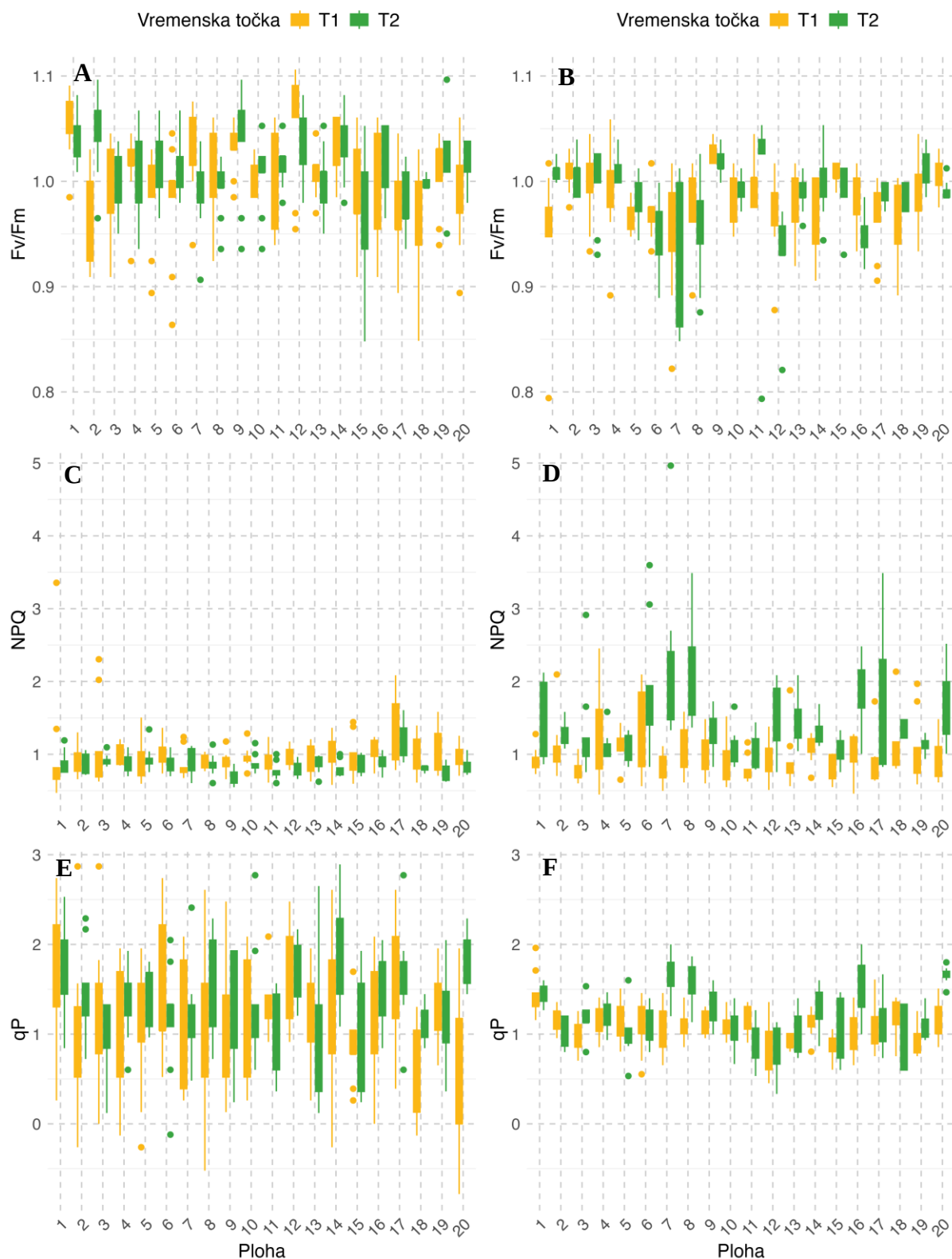


Slika 21 Oštećenja u obliku diskoloracije na transplantiranim lišajevima *Flavoparmelia caperata* (A) i *Evernia prunastri* (B) sakupljenima na plohi najbližoj rafineriji (ploha 1) nakon 7 mjeseci izlaganja (T2).

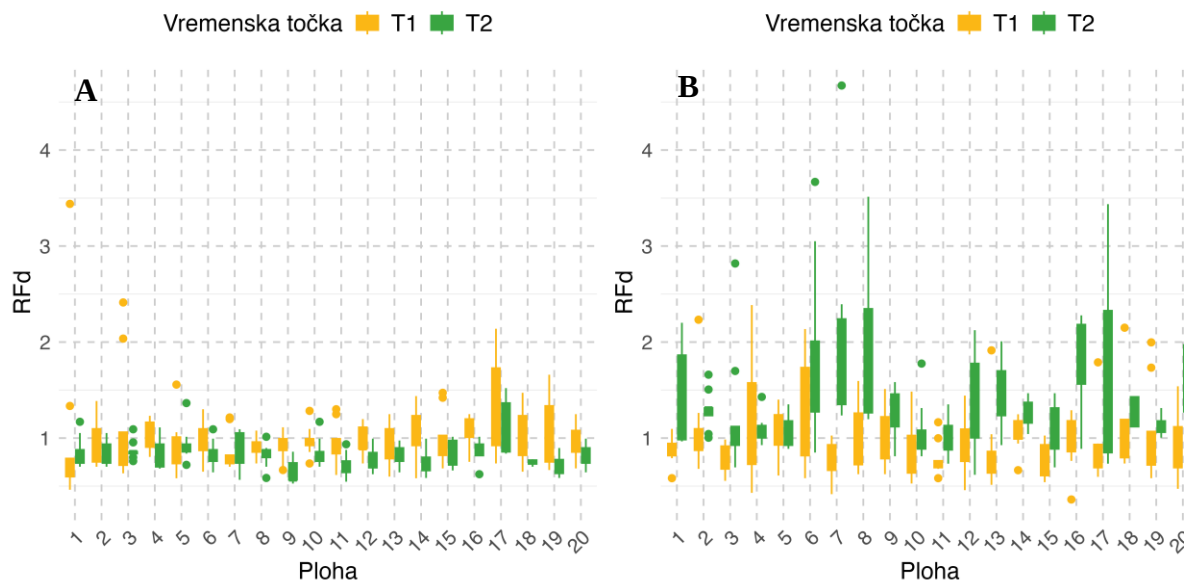
S obzirom da su vrijednosti za transplantirane lišajeve bile normalizirane s vrijednostima kontrole, u sljedećim potpoglavljima vrijednosti manje od 1 označavaju smanjenje određenog parametra, dok vrijednosti veće od 1 ukazuju na njegovo povećanje.

4.2.1. *Vitalnost transplantiranih lišajeva*

Parametar F_v/F_m je pokazao veće razlike naspram kontrole kod vrste *F. caperata*, gdje su se većinom snizile vrijednosti, najistaknutije na plohama 6-8 u T2 (Slika 22). Na plohi 1 su snižene vrijednosti bile u vremenskoj točki T1, dok su u T2 porasle na vrijednost kontrole. Kod vrste *E. prunastri* F_v/F_m je u T1 porastao na plohi 1, a snizio se na plohi 2, dok je u T2 porastao za obje plohe najbliže rafineriji. NPQ je kod uzoraka *E. prunastri* bio snižen kod gotovo svih ploha, u obje točke, osim kod 16-19, dok je kod uzoraka *F. caperata* više varirao u obje vremenske točke, te značajno porastao u T2 za plohe 1, 6-9, ali i 16-17 i 20 (Slika 22). S druge strane q_p je više varirao za vrstu *E. prunastri*, imajući većinom više vrijednosti spram kontrole te pokazujući za obje vrste povišene vrijednosti za plohu 1, u obje vremenske točke (Slika 22). Također, kod vrste *F. caperata* jasno se ističu povišene vrijednosti za plohe 7-9 te 16. R_{Fd} je pokazao, kao i NPQ, veću varijabilnosti kod vrste *F. caperata*, s više povišenih vrijednosti u točki T2, najviše na plohama 1, 6-8, 16-17 (Slika 23).

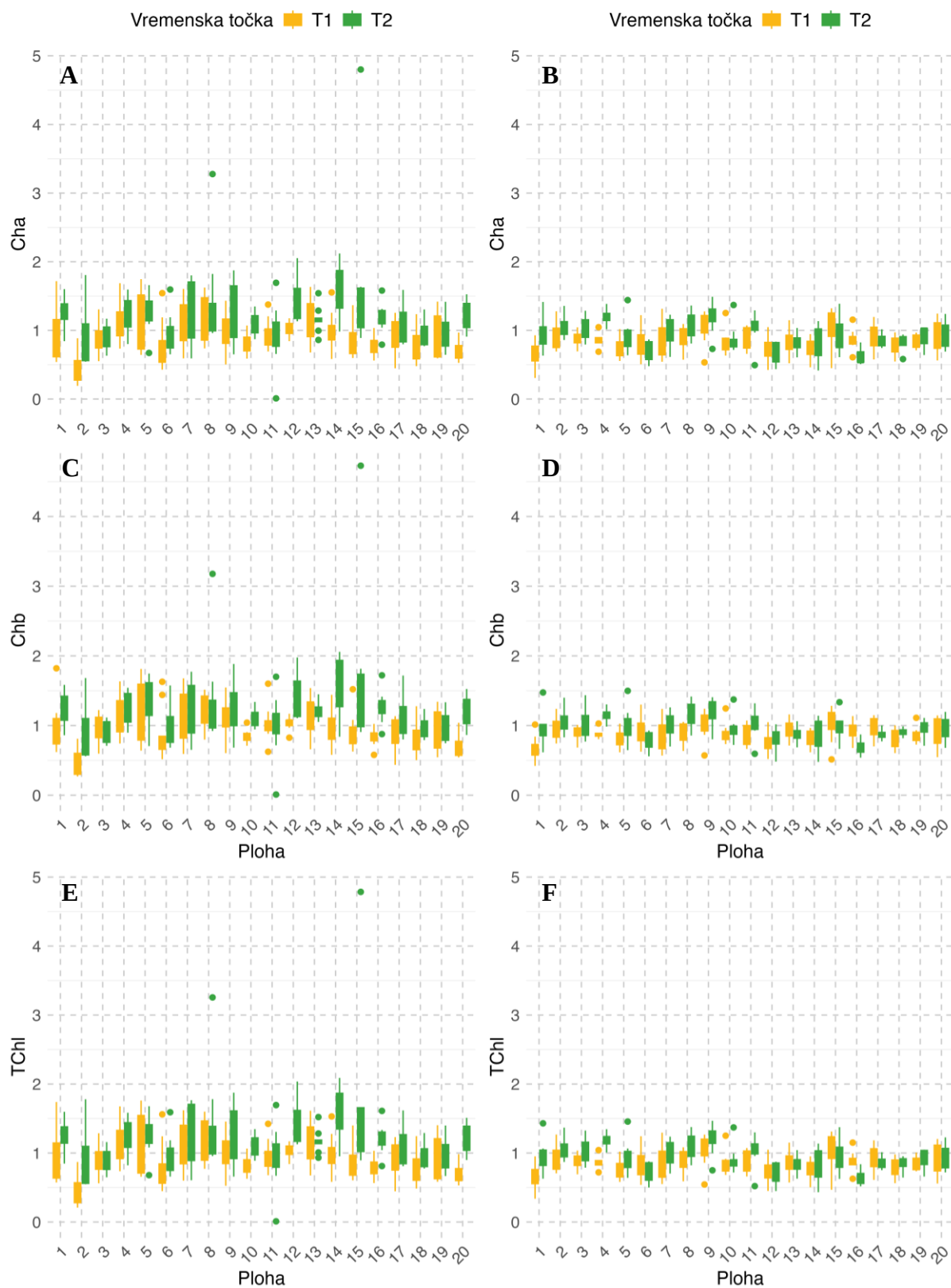


Slika 22 Box-Whisker dijagrami prikazuju parametre fluorescencije klorofila a u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2) normaliziran s kontrolom: F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije (A, B), NPQ - nefotokemijsko gašenje (C, D), q_P - fotokemijsko gašenje (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ - minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke - vrijednosti veće od 1,5 IQR.

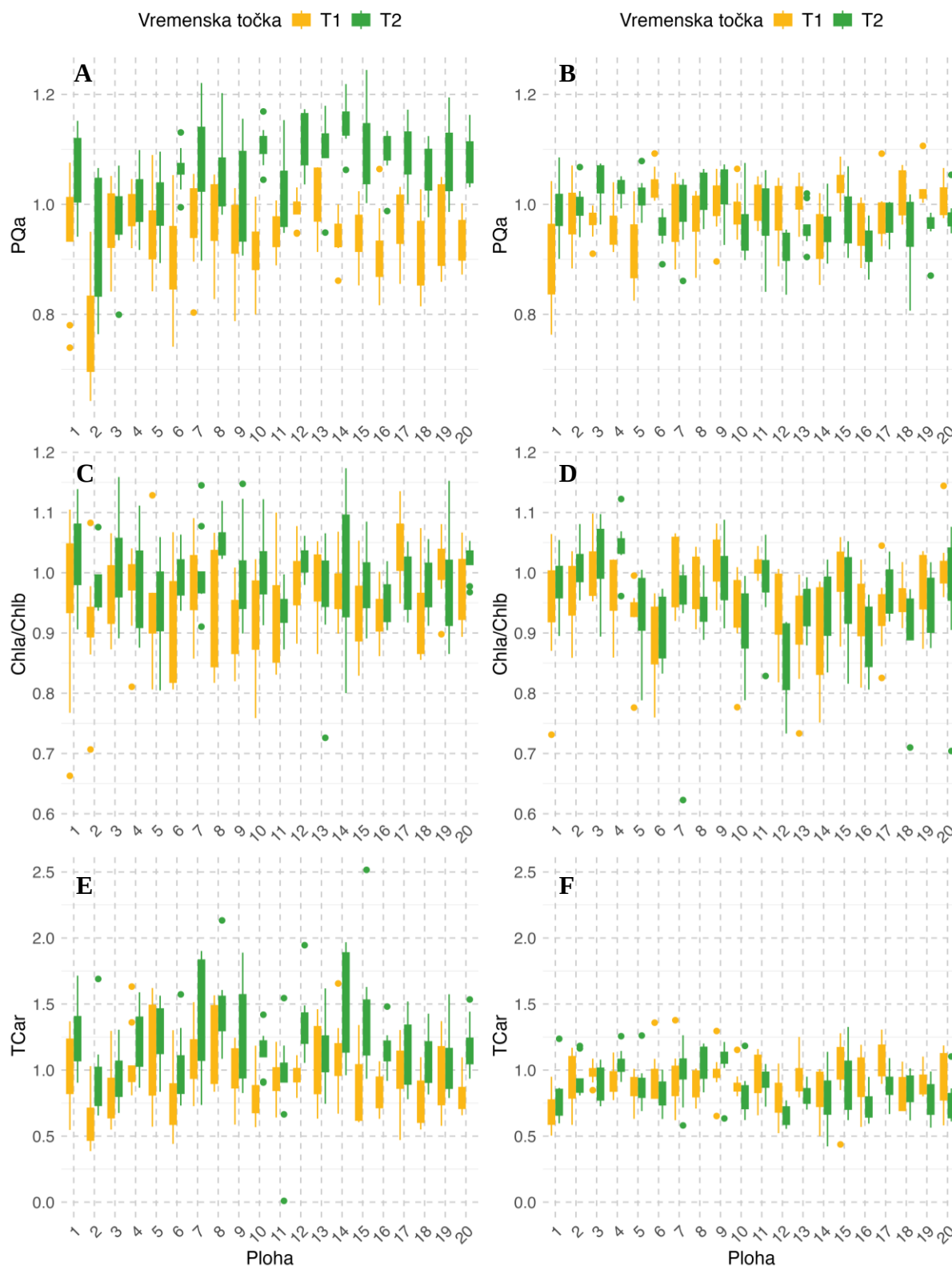


Slika 23. Box-Whisker dijagrami prikazuju omjer smanjenja fluorescencije klorofila a (R_{Fd}) u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A) i *Flavoparmelia caperata* (B), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2) normaliziran s kontrolom. Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

Vrijednosti zabilježene za fotosintetske pigmente pokazuju veću varijabilnost kod vrste *E. prunastri*, spram vrste *F. caperata* (Slika 24, Slika 25), s najčešće višim vrijednostima za T2. Tako su za plohu 2 snižene vrijednosti svih parametara kod uzoraka *E. prunastri* zabilježene u T1, međutim, one su porasle u T2, dok je kod uzoraka *F. caperata* to slučaj kod plohe 1. Najveći porast koncentracije Chl *a* i Chl *b* (samim time i TChl) zabilježen je na plohama 7, 9, 12, 14, 15 kod vrste *E. prunastri*, te na plohama 4, 8 i 9 za vrstu *F. caperata* (Slika 24). Najveća razlika između T1 i T2 je zabilježena kod PQa kod vrste *E. prunastri*, gdje je nakon tri mjeseca izlaganja (T1) prvenstveno zabilježen pad, a zatim nakon sedam mjeseci porast (T2) (Slika 25). Omjer Chl *a*/Chl *b* se kod vrste *E. prunastri* za većinu ploha povećao, dok se kod vrste *F. caperata* smanjio u T2, spram T1 (Slika 25). Koncentracija TCar je kod vrste *E. prunastri* povišena za 50 % kod ploha 7-9, 14-15 u T2, dok kod vrste *F. caperata* nisu zabilježene tolike razlike (Slika 25).



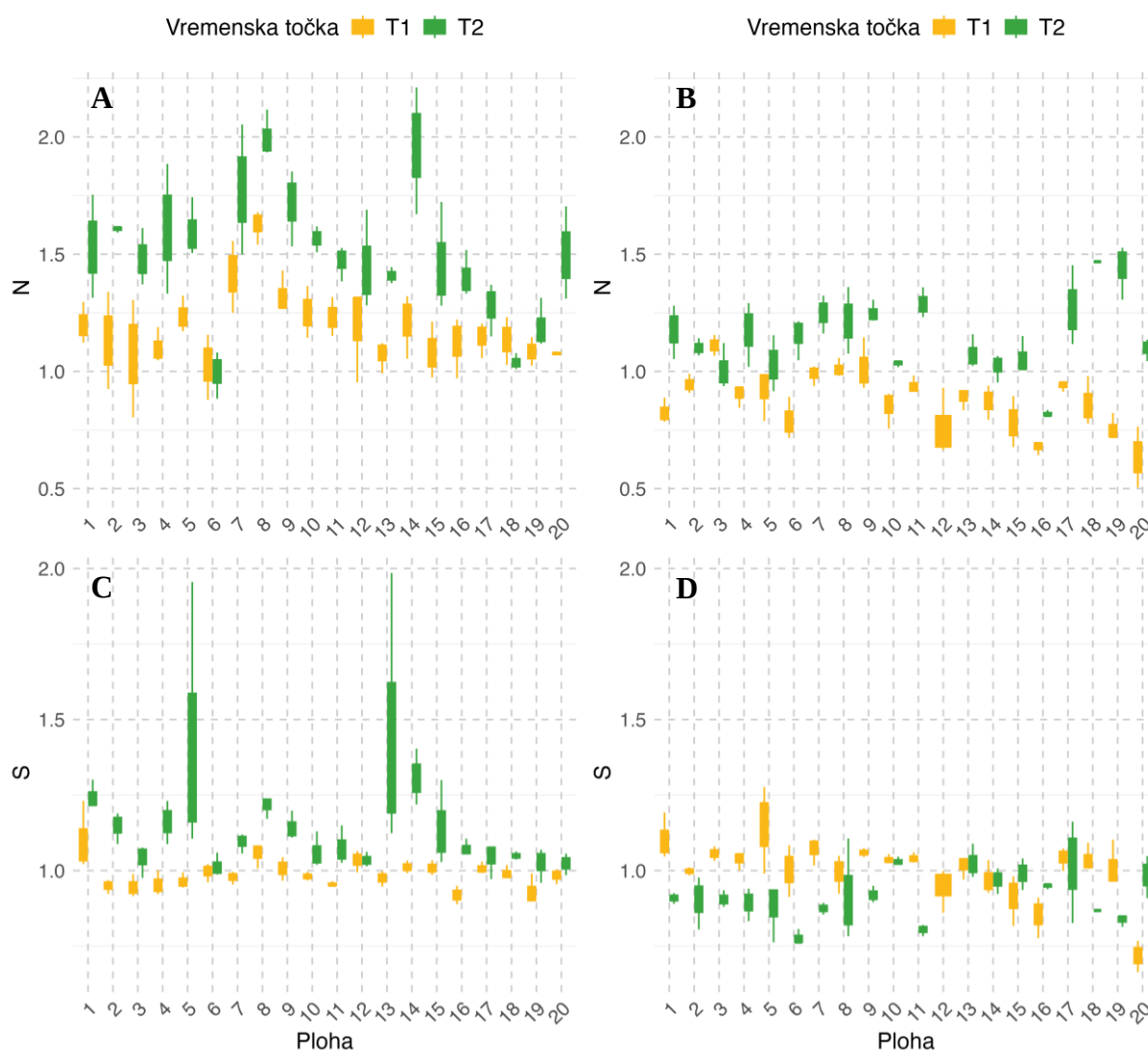
Slika 24 Box-Whisker dijagrami prikazuju fotosintetske pigmente u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2) normaliziran s kontrolom: Chl a - klorofil a (A, B), Chl b - klorofil b (C, D), TChl – ukupni klorofil (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ – interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.



Slika 25 Box-Whisker dijagrami prikazuju fotosintetske pigmente u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2) normaliziran s kontrolom: PQa – kvocijent feofitinizacije (A, B), Chl a/ Chl b – omjer klorofila a i b (C, D), TCar – ukupni karotenoidi (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ – interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

4.2.2. Bioakumulacija elemenata u transplantiranim lišajevima

Kada se sagleda bioakumulacija nemetala, vidljivo je kako je kod vrste *E. prunastri* došlo do bioakumulacije N i S u obje vremenske točke, s time da je u točki T2 (nakon 7 mjeseci izlaganja) značajno viša akumulacija, do dva puta spram kontrole za neke od ploha (Slika 26). Najviše vrijednosti N u obje vremenske točke zabilježene su u lišajevima na ploham 7-9, dok se u T2 ističe još i ploha 14. U slučaju S za T1 najviša je vrijednost u lišajevima na plohi 1, dok su u T2 visoke vrijednosti i u lišajevima s ploha 5, 8 i, 13 i 14. Kod vrste *F. caperata* u T1 nije došlo do akumulacije N, dapače, većina vrijednosti je ispod koncentracije kontrole, međutim, u T2 većina uzoraka je imala vrijednosti veće od kontrole. Zanimljivo je da se kod S dogodilo suprotno, barem za plohe 1-10.

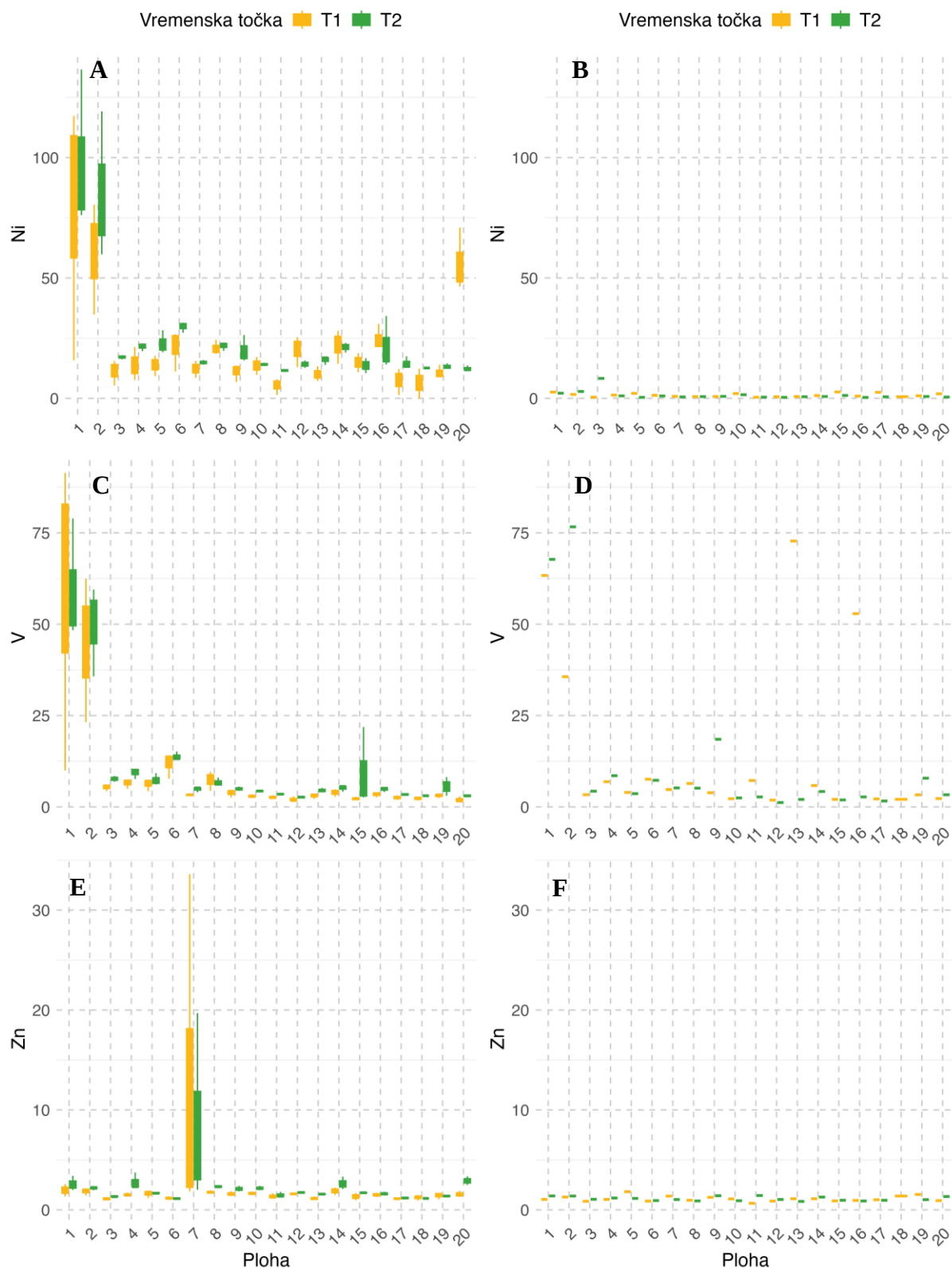


Slika 26 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj nemetala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C) i *Flavoparmelia caperata* (B, D), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: N – dušik (A, B), S – sumpor (C, D). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ – interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

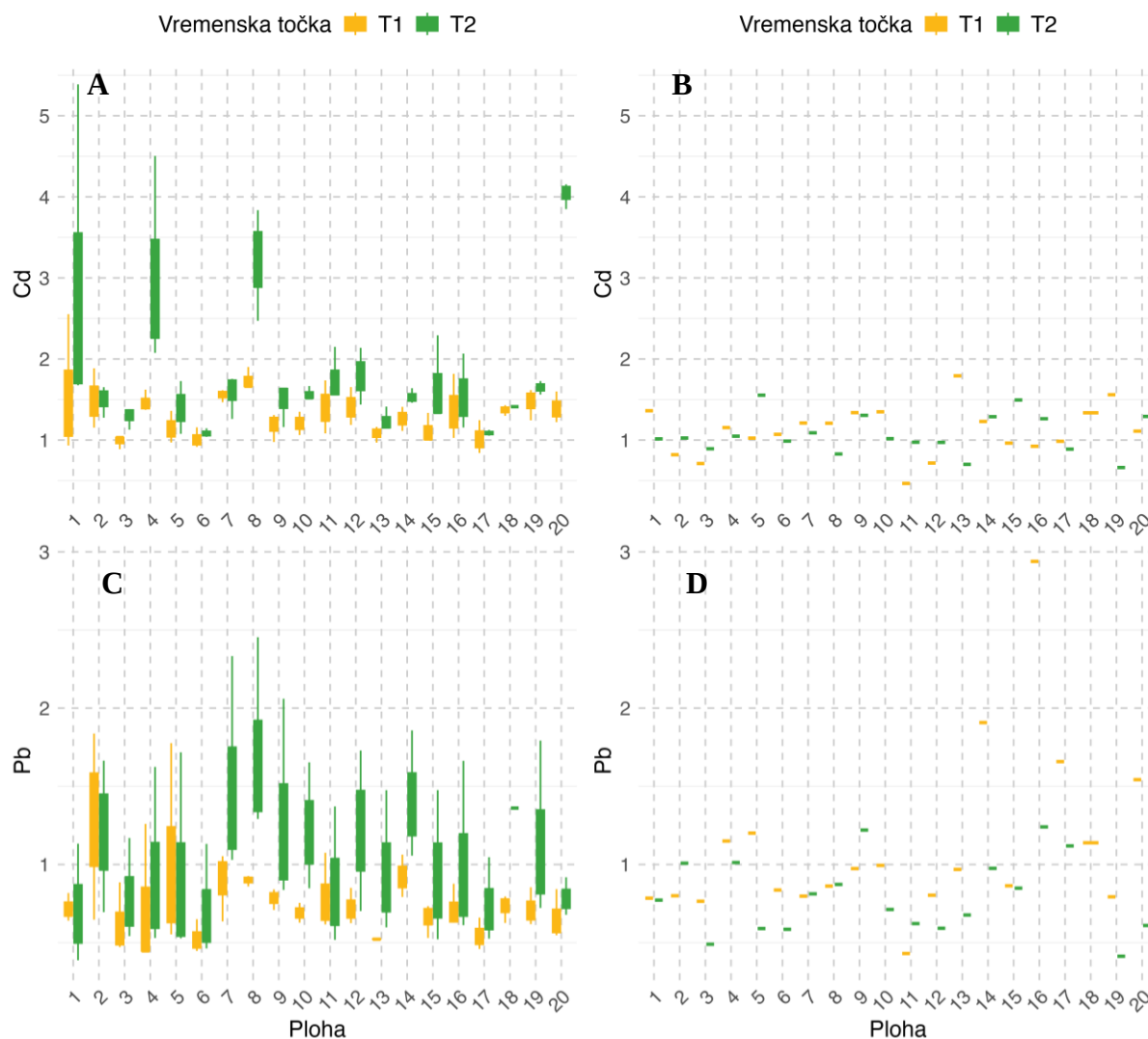
Kada se gledaju rezultati bioakumuliranih metala, kao što je objašnjeno u „Materijalima i metodama“, prvenstveno ću se oslanjati na rezultate na vrsti *E. prunastri*, zbog većeg broja uzoraka, što čini analizu pouzdanijom. Međutim, prikazala sam i rezultate dobivene za vrstu *F. caperata*.

Kod vrste *E. prunastri* zabilježene su ekstremno visoke vrijednosti Ni i V na dvije plohe najbliže rafineriji u obje vremenske točke, s vrijednostima koncentracije Ni oko 100 puta višim od koncentracije prije transplantacije, dok je akumulacija V bila oko 50 puta veća (Slika 27). Također, visoka bioakumulacija (20-25 puta) je zabilježena i na ostalim plohama za ova dva metala. Kod vrste *F. caperata* vrijednosti bioakumulacije za Ni su puno niže (oko 2 puta), dok su za V visoke (do 70 puta) na najbližim plohama. Iznimno visoke vrijednosti za Zn zabilježene su samo kod vrste *E. prunastri* i to u obje vremenske točke na plohi 7 (Slika 27). Zabilježena je značajnija bioakumulacija Cd u uzorcima *E. prunastri*, ali prvenstveno u T2 na plohama 1, 8 i 20. Za Pb u uzorcima *E. prunastri* u T1 nije bilo bioakumulacije, osim na plohi 2, međutim, u T2, dogodila se bioakumulacija, prvenstveno na plohama 7-10, 12 i 14 (Slika 28). Kod vrste *F. caperata* za Zn, Cd i Pb nisu zabilježene visoke bioakumulacije, s većinom vrijednosti do 2 puta većima od kontrole (Slika 27, Slika 28).

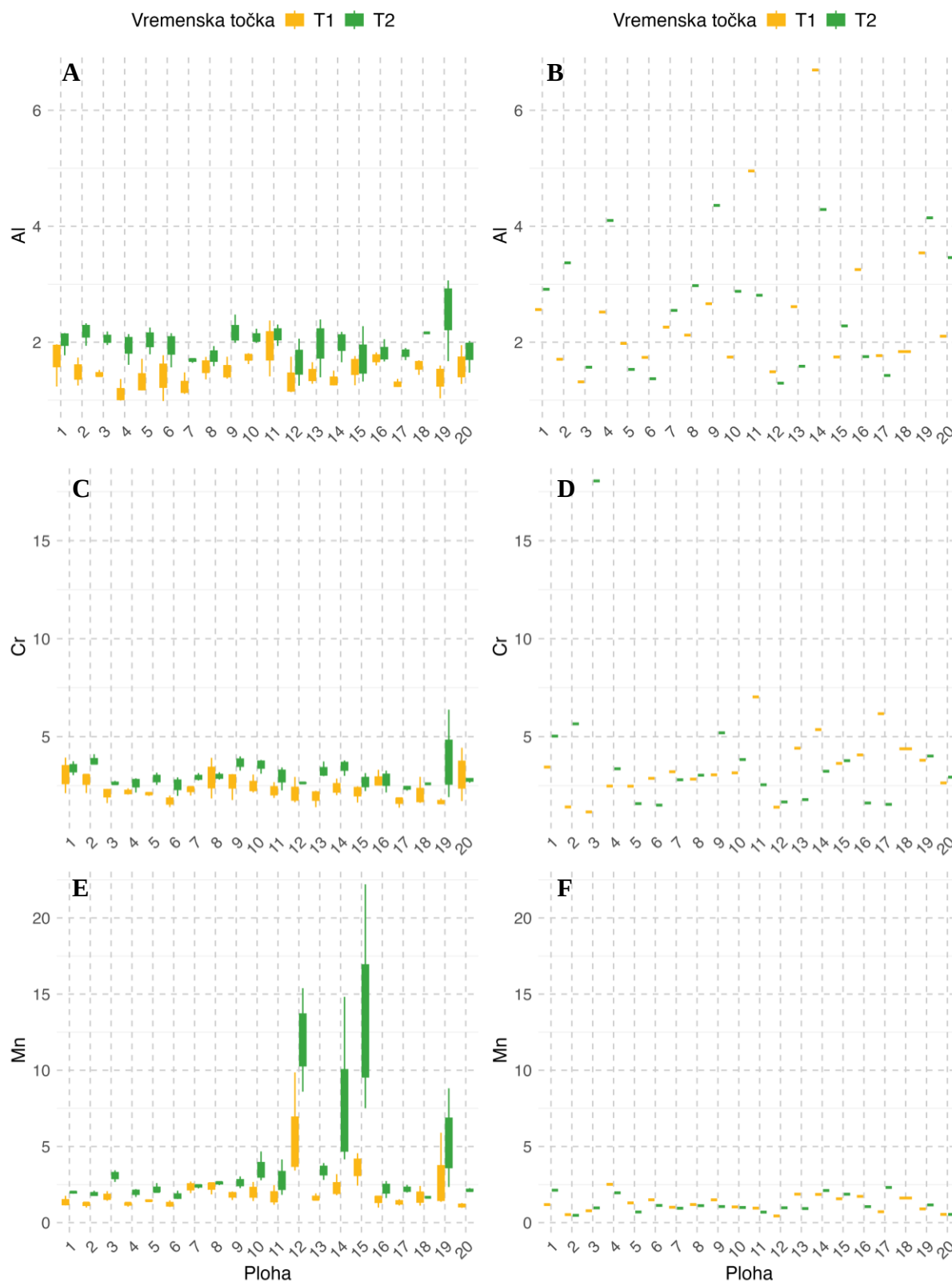
Kada se pogledaju vrijednosti ostalih mjerenih metala (Slika 29, Slika 30, Slika 31, Slika 32), u blizini rafinerije se ističu visoke vrijednosti u uzorcima *E. prunastri* za Mo skupljenima na plohama 1 i 2 u obje vremenske točke (Slika 31). Također, u T2 su se pokazale povišene vrijednosti za dvije najbliže plohe rafineriji za Cr i Co, te za plohu 2 za Fe (Slika 30). Međutim, za sve te metale (Mo, Cr, Co i Fe) zabilježene su visoke vrijednosti i na nekim od udaljenijih ploha, primjerice za Mo su to plohe 15 i 16. Zanimljivo je kako Mn ima visoke vrijednosti na plohama 12 i 15 u T1 te 12-15 i 19 u T2, ali ne i u blizini rafinerije (Slika 29).



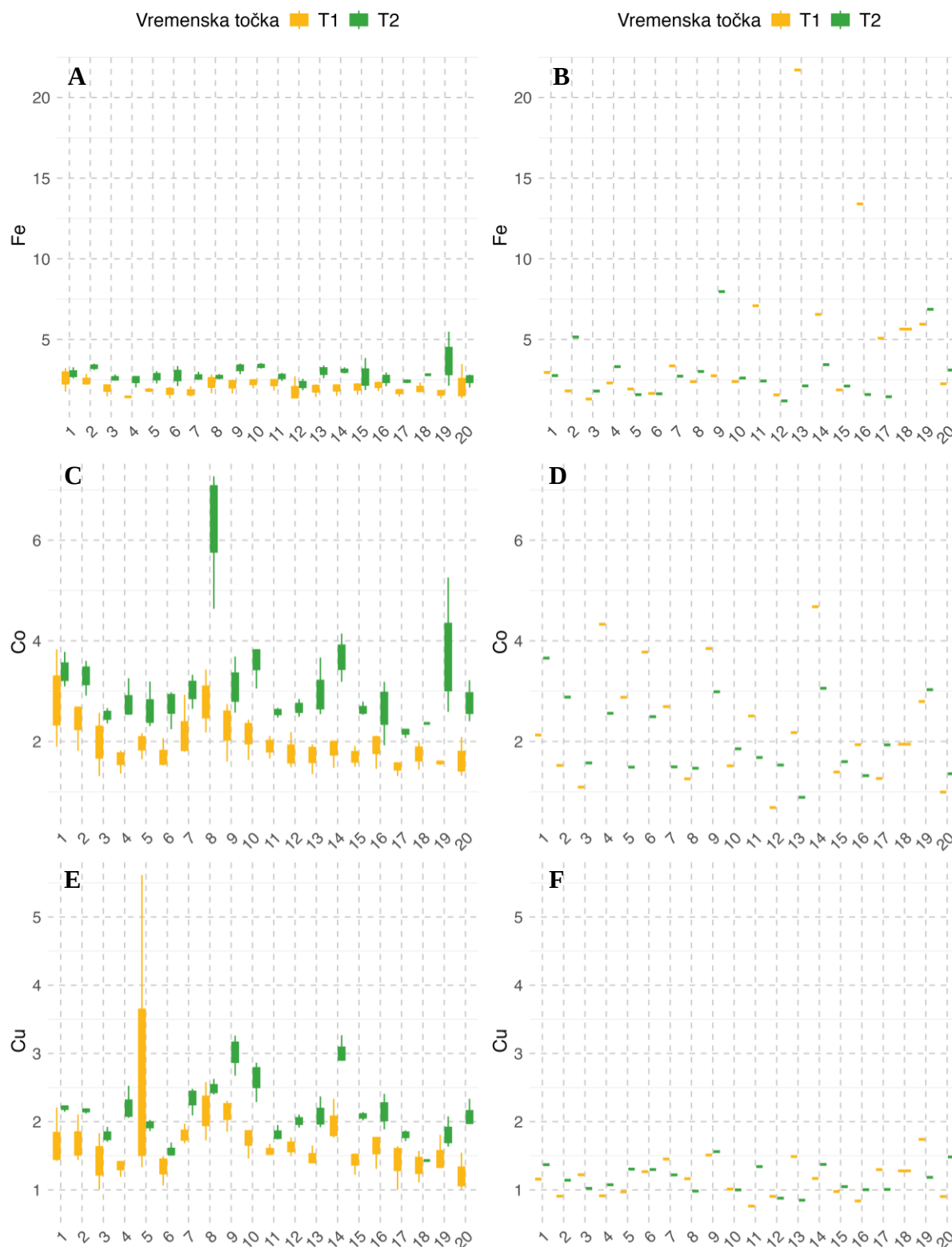
Slika 27 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj najvažnijih metala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: Ni – nikal (A, B), V – vanadij (C, D), Zn – cink (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.



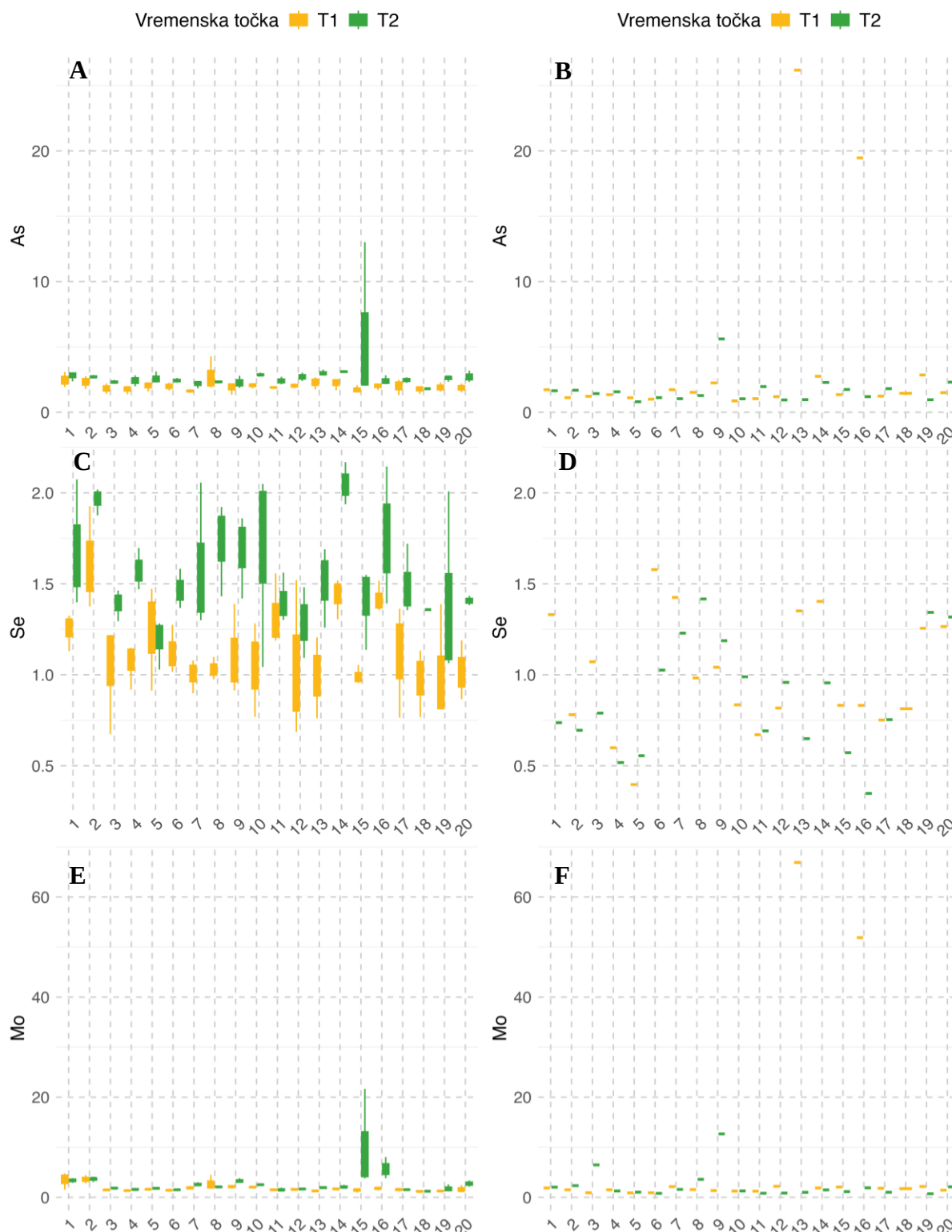
Slika 28 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj najvažnijih metala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C) i *Flavoparmelia caperata* (B, D), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: Cd – kadmij (A, B), Pb – olovo (C, D). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.



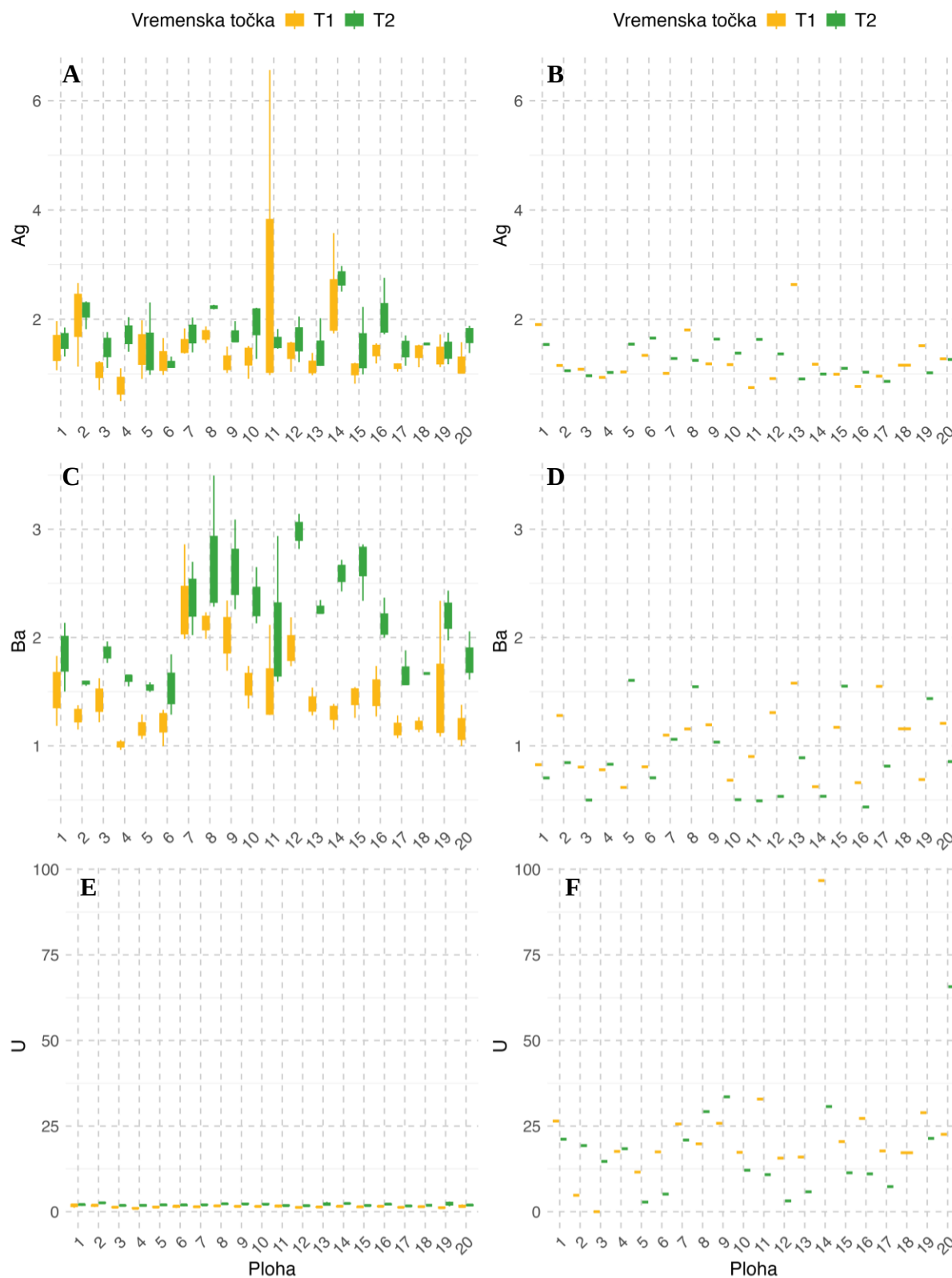
Slika 29 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj ostalih metala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: Al – aluminij (A, B), Cr – krom (C, D), Mn – mangan (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.



Slika 30 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj ostalih metala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: Fe – željezo (A, B), Co – kobalt (C, D), Cu – bakar (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

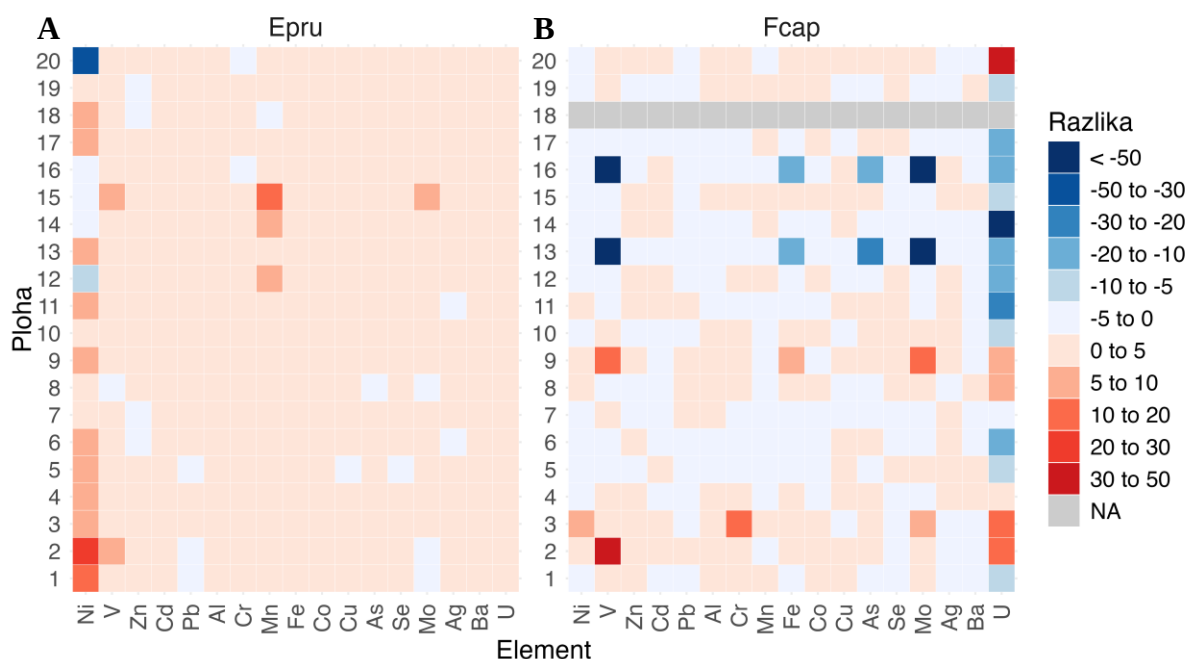


Slika 31 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj ostalih metala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: As – arsen (A, B), Se – selen (C, D), Mo – molibden (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ – interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.



Slika 32 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj ostalih metala u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri* (A, C, E) i *Flavoparmelia caperata* (B, D, F), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2), normaliziran s kontrolom: Ag – srebro (A, B), Ba – barij (C, D), U – uranij (E, F). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

Kada se sagledaju razlike između T2 i T1 (Slika 33), kod vrste *E. prunastri* je vidljivo blago povećanje bioakumulacije metala u drugoj točki (do 5) za većinu ploha, a samo nekoliko blagih smanjenja (do -5). Najveća razlika je zabilježena kod Ni, i za većinu ploha je bila pozitivna, osim kod plohe 20, najudaljenije od rafinerije, gdje je zabilježen pad. Za vrstu *F. caperata* su većinom zabilježene blage negativne i pozitivne razlike, dok su veće razlike zabilježene za U te za nekoliko metala na plohama 3, 9, 13, 16. Također, V je u višim kategorijama na plohi 2 za obje vrste (kategorije 5-10 za *E. prunastri*, 30-50 za *F. caperata*).

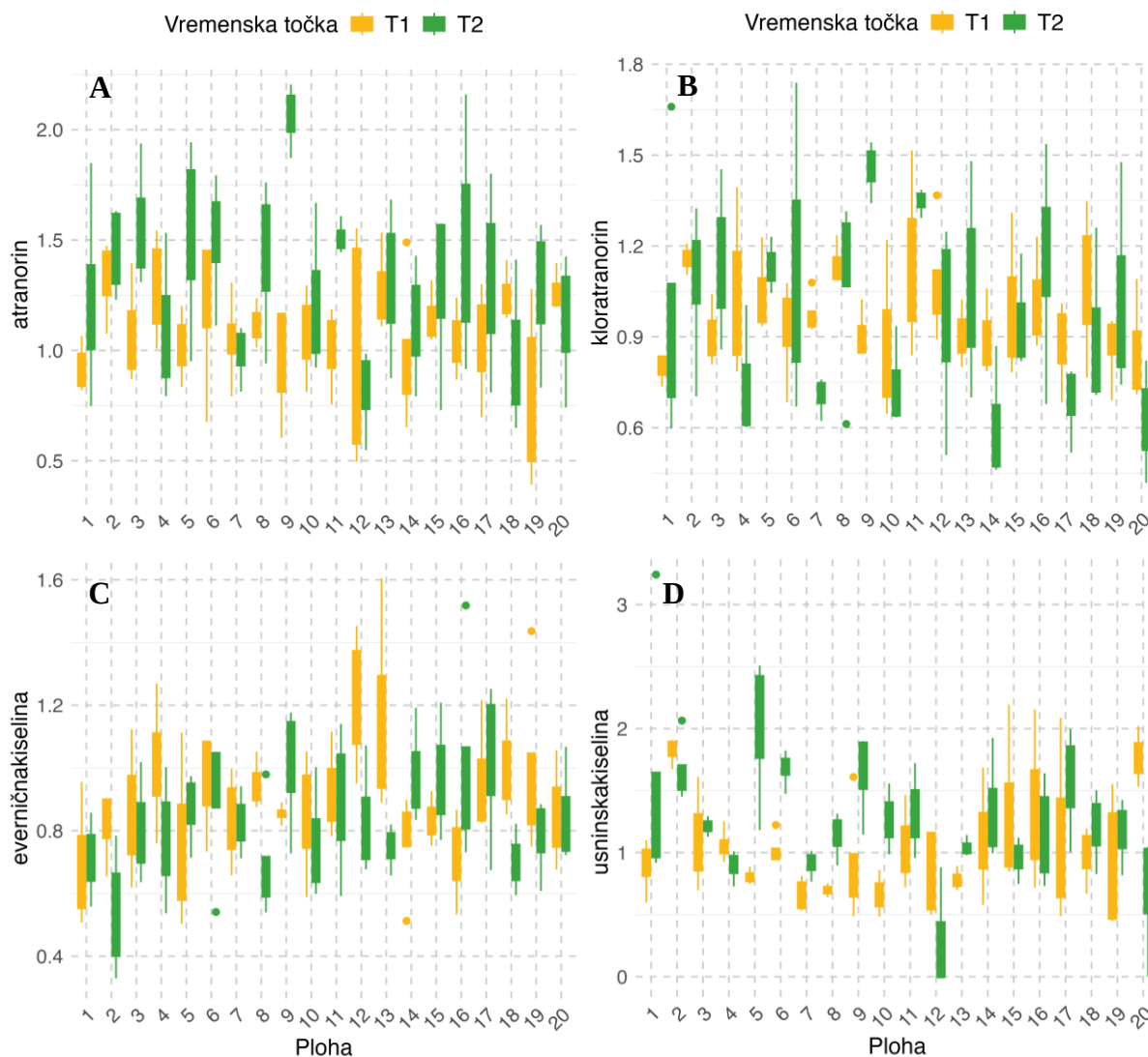


Slika 33 Razlika između srednjih vrijednosti normaliziranog sadržaja metala po plohi T2 i T1, po vrsti (A, Epru – *E. prunastri*; B, Fcap – *F. caperata*). Plohe (1 – 20) su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. NA – označava da nema podatka.

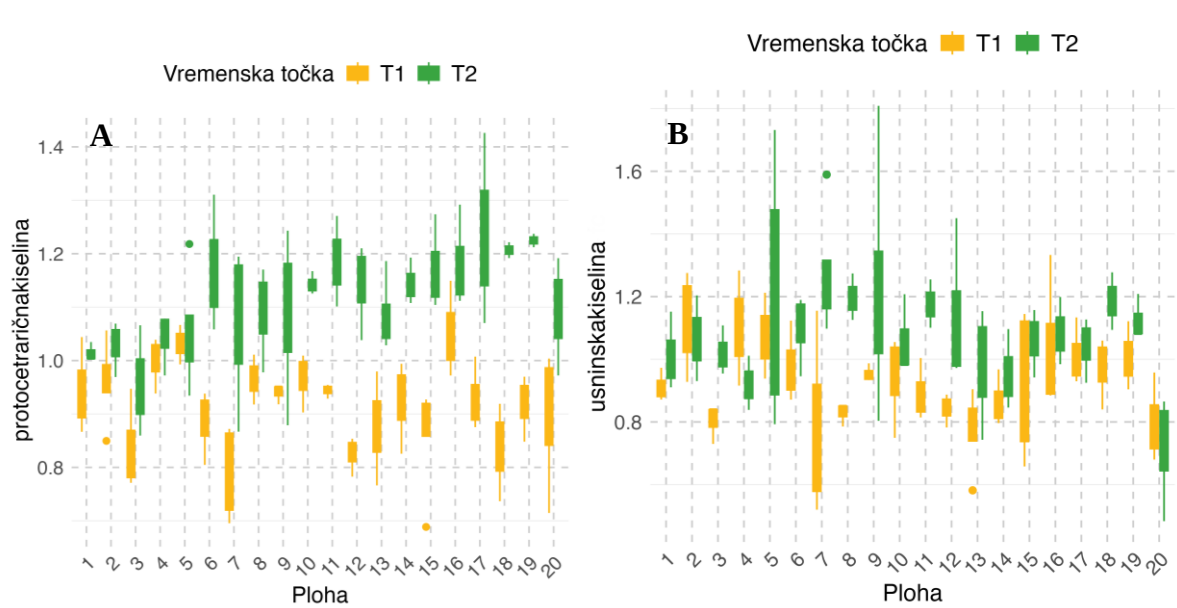
4.2.3. Sekundarni metaboliti u transplantiranim lišajevima

Sekundarni metaboliti se razlikuju za različite vrste, stoga su prikazani na odvojenim grafovima (Slika 34, Slika 35). U uzorcima *E. prunastri* su određene koncentracije četiri različita metabolita. Atranorin je na većini ploha povećan nakon transplantacije, s time da su vrijednosti više u T2. Kloratranorin je u plohi 1 najniži u T1, međutim u T2 još šest ploha ima niže vrijednosti (4, 7, 10, 14, 17, 20). Ploha 9 ima značajno najviše vrijednosti za atranorin i kloratranorin u T2. Evernična kiselina je smanjena ispod 0,8 u obje vremenske točke na plohi 1, najbližoj rafineriji. Na plohi 2 je u T2 izmjerena najniža vrijednost dok plohe 12 i 13 imaju najviše vrijednosti u T1. U slučaju usninske kiseline ističe se ploha 2 s povišenim vrijednostima (iznad 1,5) za obje vremenske točke, dok je najviša vrijednost zabilježena na plohi 5 u T2, te najniža na plohi 12 u T2.

U slučaju sekundarnih metabolita prisutnih u vrsti *F. caperata*, vrijednosti za protocetraričnu i usninsku kiselinu su za većinu ploha više u T2 spram T1. Protocetrarična kiselina većinom ima vrijednosti ispod 1 za T1 te iznad 1 za T2. Najniže vrijednosti zabilježene su na plohi 7 za T1 za oba sekundarna metabolita.



Slika 34 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj sekundarnih metabolita normaliziranih s kontrolom u transplantiranim uzorcima vrste *Evernia prunastri*, nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2): atranorin (A), kloratranorin (B), evernična kiselina (C), usninska kiselina (D). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

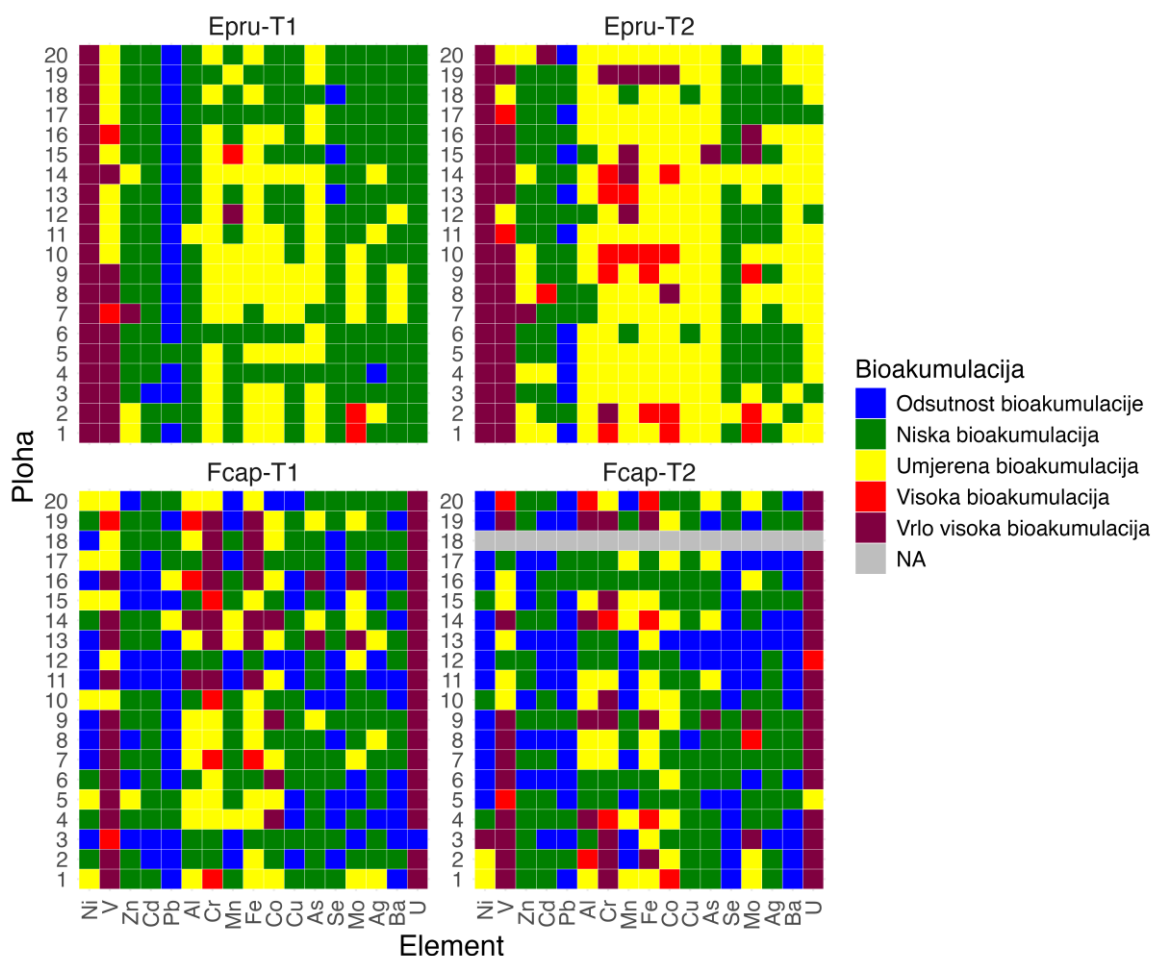


Slika 35 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj sekundarnih metabolita normaliziranih s kontrolom u transplantiranim uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata*, nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2): protocetrarična kiselina (A), usninska kiselina (B). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ - interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

4.2.4. Karte distribucije bioakumuliranih elemenata u transplantiranim lišajevima

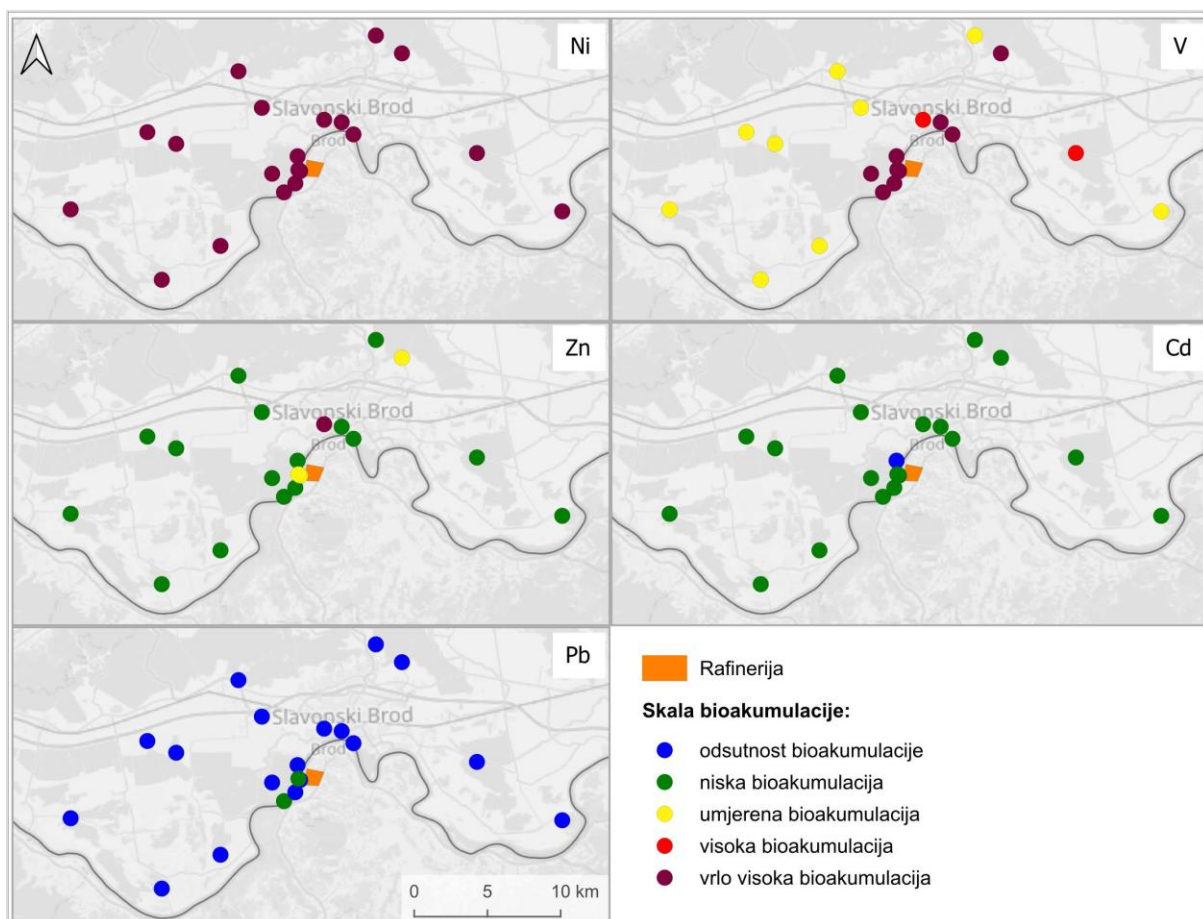
U potpoglavlju 4.2.2. su prikazane normalizirane vrijednosti bioakumulacije metala po plohi, dok je ovdje na te podatke primijenjena skala bioakumulacije prema Cecconi i sur. (2019) za transplantirane lišajeve (Slika 36). Kao što je to bilo vidljivo i iz analize razlika između vremenskih točaka (Slika 33), za vrstu *E. prunastri* se vidi kako je bioakumulacija metala veća u T2, dok je za vrstu *F. caperata* obrnuta situacija, ali i manje jasna.

Kod vrste *E. prunastri*, koju sam detaljnije analizirala zbog većeg broja uzoraka i većih masa što daje pouzdanije rezultate, vidljivo je kako na gotovo svim plohamo imamo bioakumulaciju svih metala (gotovo nema ploha u kategoriji „odsutnost bioakumulacije“, u plavoj boji), i to već u prvoj vremenskoj točki (T1), dok je u drugoj vremenskoj točki (T2) na samo nekoliko ploha za Pb zabilježena „odsutnost bioakumulacije“ (Slika 36). Na svim je plohamo zabilježena „vrlo visoka bioakumulacija“ Ni u obje vremenske točke. Za V je zabilježena „vrlo visoka bioakumulacija“ za deset te „visoka bioakumulacija“ za dvije plohe u T1, dok su u T2 gotovo sve plohe s „vrlo visokom bioakumulacijom“ (dvije imaju „visoku“ te dvije „umjerenu bioakumulaciju“). „Visoka bioakumulacija“ je zabilježena za Mo u obje vremenske točke za dvije plohe najbliže rafineriji. Također, na tim je plohamo zabilježena „visoka“ i „vrlo visoka bioakumulacija“ u T2 za Cr i Co te na plohi 2 za Fe. Za te je metale (Mo, Cr, Co i Fe) zabilježena „vrlo visoka bioakumulacija“ i na nekim od udaljenijih ploha, primjerice za Mo su to plohe 15 i 16, za Cr, Fe i Cu ploha 19. Na plohi 15 je zabilježena i „vrlo visoka bioakumulacija“ As u T2. Zanimljivo je kako Mn ima „vrlo visoku“ i „visoku bioakumulaciju“ na plohamo 12 i 15 u T1 te 10, 12-15 i 19 u T2, ali ne i u blizini rafinerije.

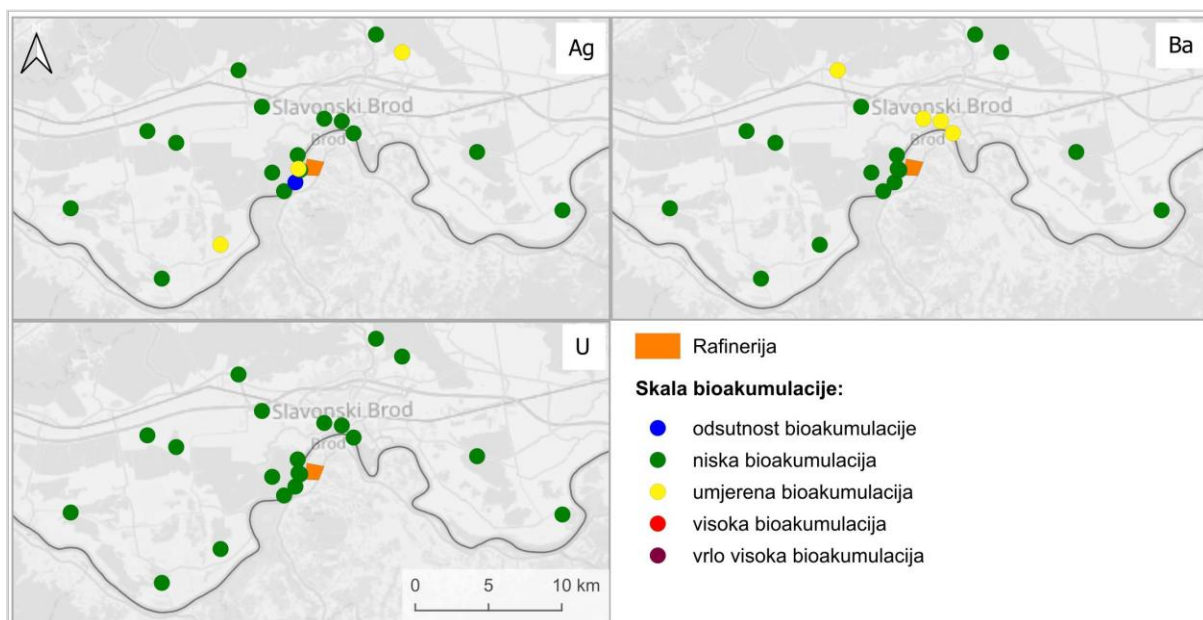


Slika 36 Primijenjena skala bioakumulacije metala (Ni – nikal, V – vanadij, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo, Al – aluminijs, As – arsen, Cu – bakar, Ba – barij, Co – kobalt, Cr – krom, Mn – mangan, Mo – molibden, Se – selen, Ag – srebro, Fe – željezo, U – uranij) za vrste *Evernia prunastri* (Epru) i *Flavoparmelia caperata* (Fcap), nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2). Plohe (1 – 20) su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. NA – označava da nema podatka.

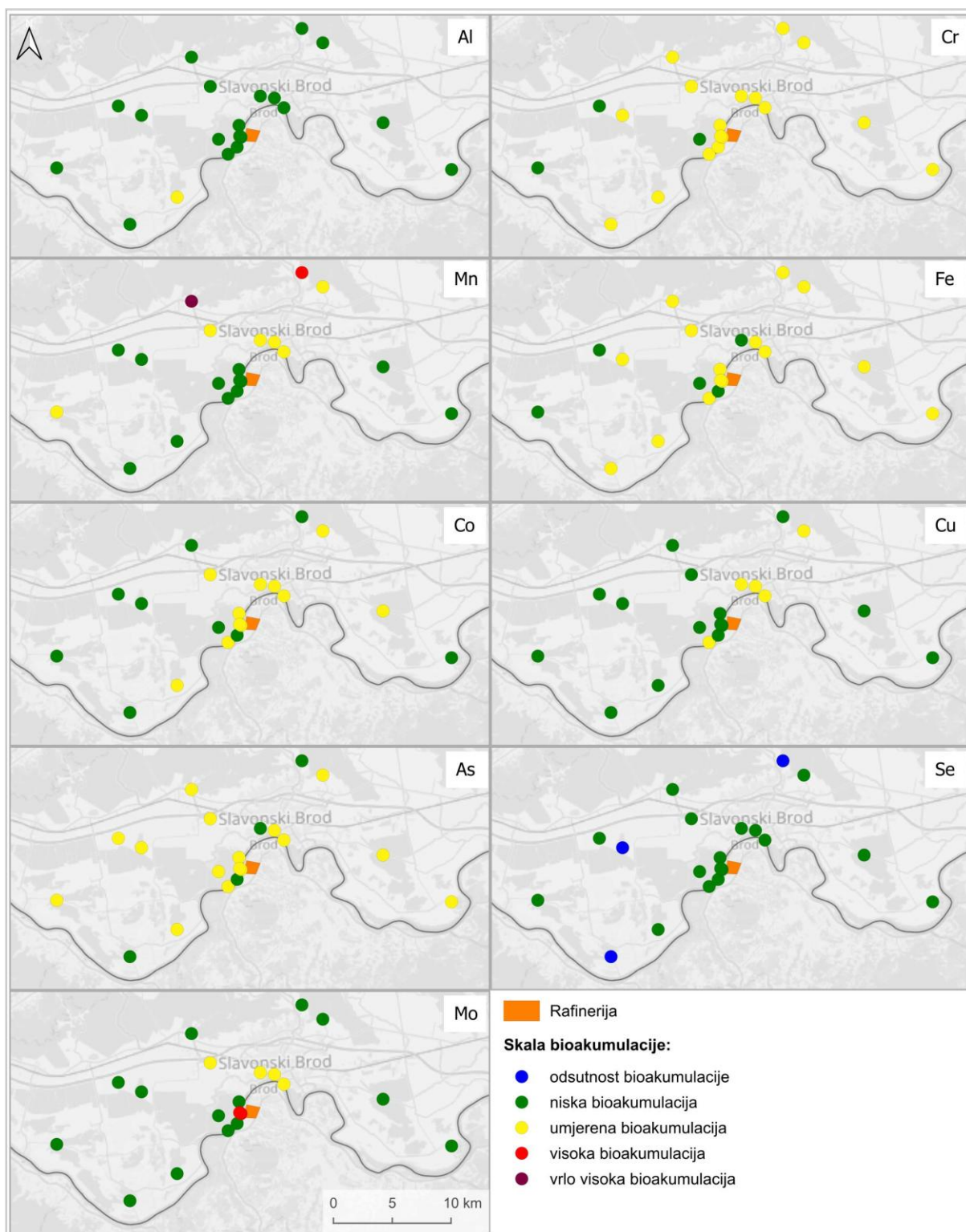
Za karte distribucije bioakumuliranih metala posebno su prikazani izdvojeni metali (Ni, V, Zn, Cd, Pb) te zatim ostatak metala bioakumuliranih u vrste *E. prunastri* nakon 3 mjeseca izlaganja (Slika 37, Slika 38, Slika 39). Iz karata je vidljivo kako u slučaju Ni sve plohe imaju „vrlo visoku bioakumulaciju“, neovisno o lokaciji plohe (Slika 37). Dok su kod V ta područja ograničena na plohe najbliže rafineriji i one u dominantnom smjeru vjetra (Slika 37). Zn ima „vrlo visoku bioakumulaciju“ samo na plohi 7, na zapadu Slavenskog Broda, te „srednje bioakumulacije“ na dvije plohe najbliže rafineriji (1 i 2) te na plohi 14, plohi gdje je V „vrlo visoke bioakumulacije“ (Slika 37). Cd i Pb imaju „nisku bioakumulaciju“ do „odsutnost bioakumulacije“ (Slika 37). Od ostalih analiziranih metala, „vrlo visoku bioakumulaciju“ bilježimo samo za Mn, i to za plohu 12 u podnožju Dilj gore, te „visoku bioakumulaciju“ na plohi 15, također u podnožju Dilj gore, ali istočnije (Slika 39). Također, Mo ima „visoku bioakumulaciju“ na ploham 1 i 2, najbližima rafineriji (Slika 39).



Slika 37 Karte bioakumulacije za metale (Ni – nikal, V – vanadij, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo) u transplantiranim uzorcima vrste E, prunastri izloženima 3 mjeseca. Pozadinska karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.

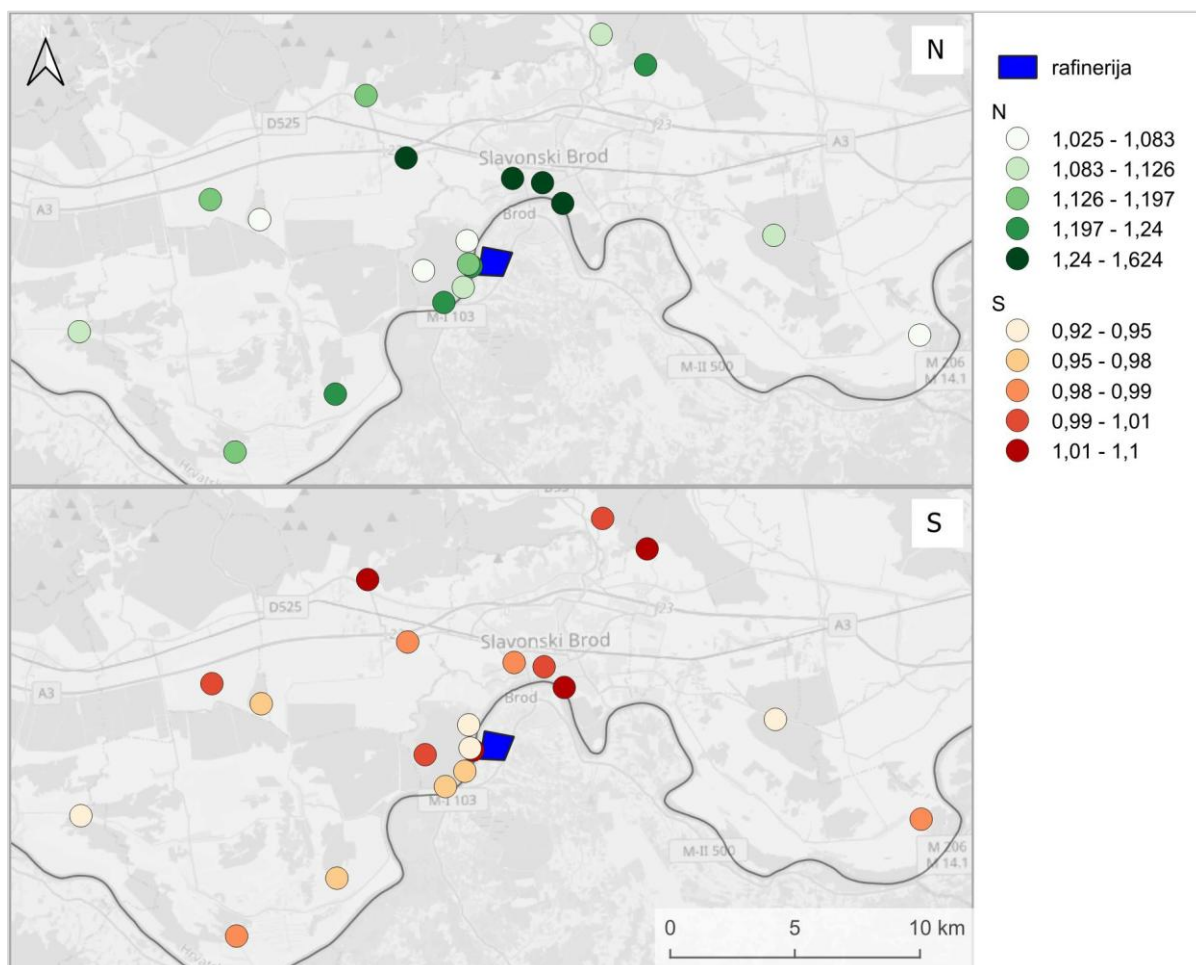


Slika 38 Karte bioakumulacije za metale (Ag – srebro, Ba – barij, U - uranij) u transplantiranim uzorcima vrste E, prunastri izloženima 3 mjeseca. Pozadinska karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.



Slika 39 Karte bioakumulacije za metale (Al – aluminij, Cr – krom, Mn – mangan, Fe – željezo, Co – kobalt, Cu – bakar, As – arsen, Se – selen, Mo – molibden) u transplantiranim uzorcima vrste *E. prunastri* izloženima 3 mjeseca. Pozadinska karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.

Kod bioakumulacije nemetala kod vrste *E. prunastri* nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) vidljivo je povišenje vrijednosti N spram kontrole na svim ploham, međutim, najviše vrijednosti su upravo na ploham 7-9, koje se nalaze unutar Slavenskog Broda te u dominantnom smjeru vjetrova iz rafinerije nafte, te na plohi 10 (Slika 40). S druge strane, S nije toliko povišen spram kontrole te se bioakumulacija u T1 prvenstveno dogodila na plohi 1 (plohi najbližjoj rafineriji, koja se ne vidi toliko dobro na karti) te ploham 8 (istok grada) i 12 (sjeverozapadno od rafinerije, podnožje Dilj gore).



Slika 40 Karta normaliziranih vrijednosti za dušik (N) i sumpor (S) izmjerene u transplantiranim uzorcima vrste *E. prunastri* izloženima 3 mjeseca, prikazane kao pet klasa u jednakim kvantilima. Pozadinska karta © OpenStreetMap suradnici, CC BY-SA.

4.2.5. Usporedba ploha prema uzorcima transplantiranih lišajeva

Za transplantirane uzorke vrsta *F. caperata* i *E. prunastri* sakupljenima nakon tri (T1) i sedam mjeseci (T2) analizirala sam postoje li statistički značajne razlike između ploha za svaki od istraživanih parametara - vitalnost lišajeva: F_v/F_m , q_p , NPQ, R_{Fd} , Chl *a*, Chl *b*, TChl, PQa, Chl *a*/Chl *b*, TCar; sekundarni metaboliti te nemetali N i S i metali Ni, Zn, Cd, Pb, V. Rezultati Kruskal-Wallisovih testova pokazuju statistički značajne razlike (na razini vjerojatnosti $p = 0,05$ ili strožoj) među plohami za većinu parametara.

Tako su kod vrste *E. prunastri* u T1 parametri koji nemaju statistički značajne razlike: q_p , NPQ, R_{Fd} , Pb i svi sekundarni metaboliti (evernična kiselina, usninska kiselina, atranorin, kloratranorin) (Tablica 8). U T2 je manje takvih parametara, odnosno statistički značajne razlike i dalje nemaju samo Pb i većina sekundarnih metabolita (evernična kiselina, atranorin, kloratranorin) (Tablica 9).

Kod vrste *F. caperata* u T1, parametri koji nemaju statistički značajne razlike su: NPQ, R_{Fd} , Chl *b* te jedan sekundarni metabolit (usninska kiselina) (Tablica 10), dok u T2 samo sekundarni metaboliti nemaju značajne razlike (Tablica 11). Metale nije bilo moguće usporediti ovom metodom, jer je riječ o po samo jednoj replici po plohi, dok u T2 nemetali nemaju relevantne vrijednosti radi jedne nedostajuće plohe (označene sivo u tablici).

Iako niti jedan od parametara nije pokazao jasnu povezanost s udaljenošću od rafinerije nafte, neki potencijalni obrasci su se ipak pojavili, što je dalje istraženo u narednim poglavljima.

Tablica 8 Vrijednosti zavisnih varijabli u uzorkovanim transplantiranim lišajevima Evernia prunastri nakon tri mjeseca izlaganja (T1), po istraživačkoj plohi, normalizirane sa srednjom vrijednosti kontrole (srednja vrijednost; obojano prema varijablama na skali boja – najviša brojka je tamnije boje, bijela je najniža): parametri fluorescencije klorofila a (F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije, NPQ - nefotokemijsko gašenje, q_p - fotokemijsko gašenje, R_{Fd} - omjer smanjenja fluorescencije); pigmenti (Chl a - klorofil a, Chl b - klorofil b, TChl – ukupni klorofil, TCar – ukupni karotenoidi, PQa - kvocijent feofitinizacije); sadržaj nemetala (S – sumpor, N – dušik) ; sadržaj metala (Ni – nikal, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo, V - vanadij), sekundarnih metabolita (E.kis.- evernična kiselina; U.kis.- usninska kiseline; Atra. –atranorin; Chlor. – kloratranorin). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. H – Kruskal-Wallis statistika; p(H) - vjerojatnost Kruskal-Wallis statistika, N - veličina uzorka (broj uzorkovanih lišajeva). Podebljano označava $p < 0,05$.

Ploh a	F_v/F_m	NPQ	q_p	R_{Fd}	Chl a	Chl b	TChl	PQa	Chl a/ Chl b	TCar	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	E.kis.	U.kis	Atra.	Chlor
1	1,06	1,05	1,68	1,02	0,95	0,98	0,96	0,95	0,96	0,98	1,20	1,10	77,99	1,97	1,55	0,72	58,57	0,69	0,89	0,92	0,80
2	0,97	0,93	0,97	0,96	0,43	0,45	0,44	0,78	0,92	0,60	1,13	0,95	59,96	1,84	1,49	1,27	44,36	0,82	1,82	1,32	1,16
3	0,99	1,07	1,22	1,10	0,90	0,92	0,90	0,96	0,97	0,86	1,07	0,95	11,11	1,11	0,98	0,62	5,37	0,86	1,11	1,08	0,91
4	1,01	1,03	1,06	1,05	1,10	1,13	1,11	0,99	0,97	1,05	1,10	0,95	13,95	1,56	1,47	0,72	6,48	1,01	1,06	1,28	1,04
5	0,99	0,92	1,04	0,93	1,11	1,19	1,13	0,95	0,93	1,12	1,24	0,96	13,77	1,61	1,15	1,01	6,15	0,76	0,81	1,02	1,04
6	0,98	0,99	1,51	0,97	0,83	0,89	0,84	0,90	0,93	0,79	1,03	1,00	21,08	1,19	1,01	0,53	11,81	0,96	1,02	1,21	0,93
7	1,03	0,86	1,22	0,85	1,09	1,13	1,10	0,96	0,97	1,09	1,41	0,98	12,21	12,70	1,55	0,89	3,26	0,84	0,66	1,05	0,97
8	1,02	0,88	1,09	0,90	1,17	1,19	1,18	0,96	0,96	1,18	1,62	1,06	20,82	1,79	1,74	0,90	7,33	0,95	0,70	1,12	1,14
9	1,03	0,89	1,01	0,89	1,02	1,10	1,04	0,94	0,92	0,98	1,33	1,01	10,88	1,60	1,18	0,78	3,75	0,85	0,89	0,96	0,91
10	1,01	0,96	1,10	0,97	0,79	0,84	0,80	0,90	0,92	0,81	1,25	0,98	13,54	1,65	1,21	0,69	2,92	0,85	0,66	1,07	0,87
11	0,99	0,92	1,39	0,95	0,95	1,03	0,97	0,95	0,93	0,92	1,23	0,96	5,24	1,39	1,40	0,79	2,72	0,93	1,05	1,01	1,14
12	1,06	0,95	1,62	0,96	1,04	1,04	1,04	0,99	0,99	0,97	1,19	1,03	20,09	1,62	1,41	0,72	2,13	1,22	0,84	1,02	1,08
13	1,01	0,93	1,19	0,94	1,15	1,14	1,15	1,01	0,99	1,07	1,07	0,97	10,06	1,15	1,08	0,52	2,95	1,16	0,78	1,27	0,91
14	1,04	1,01	1,29	1,05	0,97	0,99	0,98	0,94	0,98	1,07	1,21	1,01	21,95	1,89	1,26	0,92	3,93	0,77	1,11	0,97	0,89
15	0,99	0,95	0,94	0,98	0,86	0,92	0,87	0,94	0,93	0,88	1,08	1,01	14,91	1,33	1,12	0,65	2,27	0,83	1,32	1,15	0,99
16	1,00	1,05	1,13	1,07	0,78	0,83	0,79	0,92	0,93	0,85	1,12	0,92	24,71	1,50	1,37	0,71	3,39	0,72	1,35	1,04	1,01
17	0,97	1,30	1,62	1,33	0,94	0,89	0,93	0,97	1,04	0,97	1,14	1,01	7,33	1,15	1,02	0,55	2,56	0,96	1,12	1,04	0,88
18	0,96	0,98	0,64	1,00	0,79	0,83	0,80	0,92	0,95	0,78	1,13	0,99	6,33	1,20	1,37	0,73	2,33	1,01	0,98	1,25	1,08
19	1,01	1,03	1,33	1,04	0,94	0,92	0,93	0,97	1,01	0,95	1,08	0,93	10,67	1,43	1,47	0,72	2,99	0,99	0,93	0,80	0,87
20	0,99	0,98	0,57	0,99	0,70	0,71	0,70	0,94	0,98	0,80	1,08	0,98	55,90	1,57	1,39	0,66	1,99	0,85	1,77	1,27	0,85
H	52,37	19,82	27,36	20,49	50,43	52,21	50,44	41,61	31,80	41,55	30,48	39,43	43,62	36,13	33,17	25,77	49,78	21,87	26,20	16,81	21,39
p(H)	0,0001	0,4052	0,0966	0,3658	0,0001	0,0001	0,0001	0,002	0,0329	0,002	0,046	0,0039	0,0011	0,0102	0,023	0,1366	0,0001	0,2909	0,1247	0,6028	0,3158
N	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	60	60	60	60	60	60	60	68	68	68	68

Tablica 9 Vrijednosti zavisnih varijabli u uzorkovanim transplantiranim lišajevima Evernia prunastri nakon sedam mjeseci izlaganja (T2) po istraživačkoj plohi, normalizirane sa srednjom vrijednosti kontrole (srednja vrijednost; obojano prema varijablama na skali boja – najviša brojka je tamnije boje, bijela je najniža): parametri fluorescencije klorofila a (F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije, NPQ - nefotokemijsko gašenje, q_p - fotokemijsko gašenje, R_{Fd} - omjer smanjenja fluorescencije); pigmenti (Chl a - klorofil a, Chl b - klorofil b, TChl – ukupni klorofil, svi ovi @olegTCar – ukupni karotenoidi, PQa - kvocijent feofitinizacije); sadržaj nemetala (S – sumpor, N – dušik) ; sadržaj metala (Ni – nikal, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo, V - vanadij), sekundarnih metabolita (E.kis.- evernična kiselina; U.kis.- usninska kiselina; Atra. –atranorin; Chlor. – kloratranorin) u mg/g suhe tvari. Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. H – Kruskal-Wallis statistika; p(H) - vjerojatnost Kruskal-Wallis statistika, N - veličina uzorka (broj uzorkovanih lišajeva). Podebljano označava $p < 0,05$.

Ploha	F_v/F_m	NPQ	q_p	R_{Fd}	Chl a	Chl b	TChl	PQa	Chl a/ Chl b	TCar	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	E.kis.	U.kis	Atra.	Chlor
1	1,04	0,88	1,59	0,85	1,28	1,25	1,27	1,06	1,02	1,26	1,53	1,25	97,73	2,59	2,93	0,71	59,36	0,71	1,56	1,23	0,97
2	1,04	0,86	1,46	0,84	0,87	0,89	0,88	0,91	0,97	0,93	1,61	1,15	84,79	2,17	1,49	1,20	49,60	0,54	1,66	1,45	1,08
3	1,00	0,91	0,96	0,87	0,93	0,92	0,93	0,96	1,01	0,95	1,48	1,04	17,10	1,37	1,29	0,79	7,69	0,80	1,21	1,56	1,15
4	1,00	0,89	1,34	0,87	1,21	1,24	1,22	1,01	0,98	1,25	1,61	1,16	21,51	2,78	3,01	0,94	9,38	0,77	0,89	1,10	0,74
5	1,02	0,95	1,43	0,93	1,25	1,32	1,26	1,01	0,96	1,25	1,60	1,43	22,79	1,70	1,40	0,93	7,39	0,87	2,01	1,53	1,13
6	1,02	0,88	1,18	0,84	0,94	0,94	0,94	1,07	0,99	1,00	0,99	1,01	29,78	1,13	1,08	0,71	13,84	0,91	1,68	1,51	1,12
7	0,99	0,92	1,24	0,88	1,26	1,25	1,26	1,08	1,00	1,35	1,78	1,09	14,89	8,57	1,58	1,51	4,80	0,83	0,91	0,99	0,71
8	0,99	0,86	1,59	0,81	1,44	1,37	1,43	1,07	1,05	1,46	2,00	1,21	21,68	2,33	3,20	1,71	6,70	0,69	1,14	1,43	1,10
9	1,04	0,69	1,35	0,65	1,27	1,26	1,27	1,02	1,00	1,29	1,71	1,14	19,76	2,11	1,48	1,29	4,95	1,01	1,64	2,06	1,46
10	1,01	0,88	1,33	0,86	1,11	1,11	1,11	1,11	1,00	1,15	1,57	1,06	14,18	2,17	1,57	1,22	4,31	0,76	1,27	1,21	0,74
11	1,02	0,77	0,98	0,72	0,90	0,96	0,91	1,02	0,94	0,91	1,47	1,08	11,56	1,50	1,76	0,86	3,53	0,89	1,32	1,51	1,35
12	1,04	0,81	1,71	0,79	1,43	1,41	1,42	1,11	1,02	1,36	1,45	1,04	14,18	1,74	1,79	1,22	2,68	0,83	0,29	0,82	0,96
13	1,00	0,87	1,02	0,81	1,16	1,21	1,17	1,09	0,96	1,14	1,41	1,46	15,82	1,58	1,24	0,96	4,57	0,75	1,04	1,31	1,07
14	1,03	0,81	1,91	0,75	1,59	1,59	1,59	1,15	1,01	1,44	1,96	1,31	21,22	2,63	1,53	1,41	5,12	0,98	1,34	1,13	0,60
15	0,96	0,85	1,03	0,83	1,68	1,71	1,69	1,10	0,98	1,45	1,46	1,14	13,64	1,72	1,65	0,93	9,28	0,97	0,95	1,29	0,95
16	1,02	0,88	1,51	0,86	1,18	1,25	1,20	1,09	0,95	1,17	1,40	1,07	21,50	1,63	1,55	1,00	4,87	1,00	1,16	1,47	1,16
17	0,98	1,17	1,62	1,13	1,12	1,14	1,12	1,09	0,99	1,17	1,28	1,04	14,53	1,19	1,09	0,74	3,40	1,03	1,57	1,32	0,69
18	1,00	0,80	1,12	0,75	0,96	0,97	0,97	1,06	0,98	1,08	1,04	1,05	12,60	1,15	1,41	1,36	3,05	0,70	1,21	0,97	0,90
19	1,02	0,75	1,23	0,70	0,97	0,99	0,97	1,08	0,98	1,07	1,19	1,02	13,21	1,38	1,65	1,14	5,59	0,78	1,16	1,27	1,03
20	1,02	0,84	1,78	0,81	1,20	1,18	1,20	1,08	1,02	1,18	1,50	1,02	12,31	2,91	4,03	0,79	3,03	0,85	0,69	1,14	0,62
H	43,94	42,80	38,91	43,47	43,90	45,34	44,86	62,62	30,42	42,32	42,92	42,01	51,06	53,87	42,88	20,20	49,47	19,48	33,25	23,99	28,33
p(H)	0,001	0,0014	0,0045	0,0011	0,001	0,0006	0,0007	0	0,0467	0,0016	0,0013	0,0018	0,0001	0	0,0013	0,3829	0,0002	0,4267	0,0225	0,1967	0,0773
N	170	170	170	170	171	171	171	171	171	171	60	60	60	60	60	60	60	65	65	65	65

Tablica 10 Vrijednosti zavisnih varijabli u uzorkovanim transplantiranim lišajevima *Flavoparmelia caperata* nakon tri mjeseca izlaganja (T1), po istraživačkoj plohi, normalizirane sa srednjom vrijednosti kontrole (srednja vrijednost; obojano prema varijablama na skali boja – najviša brojka je tamnije boje, bijela je najniža): parametri fluorescencije klorofila a (F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije, NPQ - nefotokemijsko gašenje, q_p - fotokemijsko gašenje, R_{Fd} - omjer smanjenja fluorescencije); pigmenti (Chl a - klorofil a, Chl b - klorofil b, TChl – ukupni klorofil, svi ovi @olegTCar – ukupni karotenoidi, PQa - kvocijent feofitinizacije); sadržaj nemetala (S – sumpor, N – dušik) ; sadržaj metala (Ni – nikal, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo, V - vanadij), sekundarnih metabolita (P.kis. – protocetrarična kiselina, U.kis. – usninska kiselina) u mg/g suhe tvari. Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. H – Kruskal-Wallis statistika; p(H) - vjerojatnost Kruskal-Wallis statistika, N - veličina uzorka (broj uzorkovanih lišajeva). Podebljano označava $p < 0,05$.

Ploha	F_v/F_m	NPQ	q_p	R_{Fd}	Chl a	Chl b	TChl	PQa	Chl a/ Chl b	TCar	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	P.kis.	U.kis.
1	0,95	0,92	1,44	0,88	0,64	0,68	0,65	0,91	0,94	0,70	0,83	1,10	2,59	1,05	1,36	0,78	63,33	0,94	0,91
2	1,01	1,09	1,17	1,08	0,93	0,96	0,94	0,99	0,96	0,93	0,95	1,00	1,62	1,28	0,82	0,80	35,63	0,96	1,12
3	1,00	0,79	0,98	0,77	0,88	0,88	0,88	0,97	1,01	0,98	1,11	1,06	0,46	0,86	0,71	0,76	3,35	0,84	0,80
4	0,99	1,27	1,14	1,23	0,86	0,88	0,86	0,96	0,97	0,93	0,90	1,04	1,33	1,05	1,15	1,15	6,90	1,00	1,10
5	0,97	1,10	1,16	1,06	0,74	0,80	0,76	0,92	0,92	0,87	0,92	1,15	2,05	1,82	1,02	1,20	3,97	1,03	1,07
6	0,97	1,23	1,11	1,22	0,80	0,90	0,83	1,04	0,89	0,94	0,79	1,00	1,23	0,88	1,07	0,84	7,58	0,89	0,98
7	0,95	0,81	1,07	0,76	0,88	0,88	0,88	0,99	1,00	0,94	0,99	1,07	0,81	1,38	1,21	0,80	4,76	0,79	0,78
8	0,98	1,08	1,08	1,05	0,90	0,91	0,90	0,97	0,99	0,90	1,01	0,99	0,70	0,96	1,21	0,86	6,42	0,97	0,83
9	1,03	1,02	1,14	1,03	1,02	0,99	1,01	1,00	1,02	0,97	1,02	1,06	0,72	1,25	1,34	0,97	3,89	0,94	0,95
10	0,98	0,87	1,09	0,85	0,83	0,89	0,85	1,00	0,93	0,90	0,85	1,04	1,96	1,10	1,35	0,99	2,24	0,97	0,94
11	1,00	0,78	1,17	0,78	0,90	0,89	0,90	1,01	1,01	0,95	0,94	1,04	0,44	0,66	0,47	0,43	7,23	0,94	0,89
12	0,96	0,91	0,85	0,90	0,71	0,75	0,72	0,98	0,94	0,80	0,76	0,94	0,64	0,88	0,72	0,80	1,87	0,83	0,84
13	0,98	0,90	0,91	0,87	0,84	0,93	0,87	1,01	0,90	0,96	0,89	1,02	0,72	1,12	1,79	0,97	72,75	0,88	0,78
14	0,97	1,08	1,12	1,05	0,73	0,82	0,75	0,94	0,89	0,84	0,87	0,97	1,12	1,11	1,23	1,91	5,85	0,92	0,86
15	1,01	0,81	0,87	0,79	1,00	1,01	1,00	1,04	0,99	1,01	0,78	0,91	2,64	0,90	0,96	0,86	2,05	0,86	0,92
16	0,98	1,00	1,01	0,96	0,86	0,92	0,88	0,96	0,93	0,93	0,68	0,85	0,93	0,94	0,92	2,94	52,89	1,05	1,04
17	0,97	0,90	1,08	0,89	0,90	0,96	0,92	0,98	0,94	1,06	0,94	1,04	2,49	1,01	0,99	1,66	2,19	0,93	1,01
18	0,96	1,14	1,19	1,12	0,78	0,82	0,79	1,02	0,96	0,84	0,86	1,04	0,66	1,39	1,34	1,14	2,08	0,84	0,97
19	0,99	1,04	0,93	1,02	0,84	0,86	0,84	1,03	0,98	0,91	0,76	1,01	1,05	1,54	1,56	0,79	3,30	0,92	1,01
20	1,01	0,94	1,15	0,93	0,91	0,90	0,91	1,01	1,02	0,94	0,63	0,72	1,87	0,93	1,11	1,54	2,29	0,90	0,80
H	51,09	24,86	48,84	23,04	31,54	29,22	31,47	50,06	50,46	30,42	45,04	36,31	*	*	*	*	*	32,91	27,33
p(H)	0,0001	0,1653	0,0002	0,2354	0,0352	0,0626	0,0359	0,0001	0,0001	0,0467	0,0007	0,0097	*	*	*	*	*	0,0246	0,0972
N	163	163	163	163	163	163	163	163	163	163	60	60	20	20	20	20	20	64	64

*metoda nije prikladna za ovu grupu uzoraka, objašnjeno u tekstu

Tablica 11 Vrijednosti zavisnih varijabli u uzorkovanim transplantiranim lišajevima *Flavoparmelia caperata* nakon sedam mjeseci izlaganja (T2), po istraživačkoj plohi, normalizirane sa srednjom vrijednosti kontrole (srednja vrijednost; obojano prema varijablama na skali boja – najviša brojka je tamnije boje, bijela je najniža): parametri fluorescencije klorofila a (F_v/F_m - maksimalni prinos fluorescencije, NPQ - nefotokemijsko gašenje, q_P - fotokemijsko gašenje, R_{Fd} - omjer smanjenja fluorescencije); pigmenti (Chl a - klorofil a, Chl b - klorofil b, TChl – ukupni klorofil, svi ovi @olegTCar – ukupni karotenoidi, PQa - kvocijent feofitinizacije); sadržaj nemetala (S – sumpor, N – dušik) ; sadržaj metala (Ni – nikal, Zn – cink, Cd – kadmij, Pb – olovo, V - vanadij), sekundarnih metabolita (P.kis. – protocetrarična kiselina, U.kis. – usninska kiselina) u mg/g suhe tvari. Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. H – Kruskal-Wallis statistika; p(H) - vjerojatnost Kruskal-Wallis statistika, N - veličina uzorka (broj uzorkovanih lišajeva). Podebljano označava $p < 0,05$.

Ploha	F_v/F_m	NPQ	q_P	R_{Fd}	Chl a	Chl b	TChl	PQa	Chl a/ Chl b	TCar	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	P.kis.	U.kis.
1	1,01	1,45	1,46	1,46	0,95	0,97	0,96	0,99	0,98	0,82	1,18	0,91	2,12	1,39	1,01	0,77	67,75	1,01	1,01
2	1,01	1,30	1,04	1,30	1,07	1,06	1,07	1,00	1,01	0,93	1,10	0,90	2,84	1,39	1,03	1,01	76,64	1,03	1,07
3	1,00	1,32	1,16	1,26	1,03	1,01	1,03	1,04	1,02	0,90	1,01	0,91	8,26	1,06	0,89	0,49	4,31	0,96	1,02
4	1,01	1,11	1,21	1,09	1,20	1,14	1,18	1,03	1,04	1,05	1,17	0,89	1,00	1,19	1,05	1,01	8,54	1,04	0,92
5	0,98	1,10	1,01	1,07	0,94	1,01	0,96	1,02	0,93	0,90	1,03	0,88	0,40	1,15	1,55	0,59	3,63	1,05	1,21
6	0,95	1,91	1,09	1,93	0,69	0,75	0,70	0,96	0,90	0,82	1,15	0,78	0,97	0,93	0,99	0,59	7,29	1,17	1,10
7	0,94	2,29	1,64	2,10	0,95	1,02	0,97	0,98	0,93	0,97	1,25	0,87	0,59	1,04	1,09	0,81	5,19	1,07	1,27
8	0,96	2,10	1,57	1,96	1,08	1,15	1,10	1,02	0,94	1,04	1,22	0,92	0,70	0,89	0,83	0,87	5,14	1,09	1,20
9	1,02	1,31	1,28	1,25	1,19	1,20	1,20	1,02	0,99	1,05	1,25	0,92	0,80	1,42	1,31	1,22	18,50	1,09	1,22
10	0,99	1,06	1,07	1,09	0,88	0,96	0,90	0,96	0,91	0,80	1,03	1,03	1,49	0,91	1,02	0,71	2,46	1,14	1,06
11	1,01	1,06	0,88	1,02	1,03	1,04	1,03	0,98	0,98	0,92	1,29	0,80	0,48	1,44	0,97	0,62	2,73	1,18	1,18
12	0,92	1,45	0,81	1,35	0,67	0,79	0,70	0,91	0,86	0,66			0,41	1,04	0,97	0,59	1,19	1,14	1,14
13	0,99	1,51	1,02	1,45	0,82	0,87	0,83	0,96	0,94	0,81	1,08	1,03	0,64	0,85	0,70	0,68	2,05	1,08	0,98
14	1,00	1,32	1,29	1,27	0,81	0,85	0,82	0,96	0,94	0,80	1,02	0,97	0,75	1,28	1,29	0,98	4,22	1,14	0,95
15	0,99	1,04	1,00	1,05	0,93	0,97	0,94	0,98	0,96	0,89	1,06	0,99	1,18	0,96	1,49	0,85	1,92	1,17	1,06
16	0,95	1,84	1,52	1,78	0,62	0,69	0,64	0,92	0,90	0,74	0,82	0,95	0,37	0,89	1,26	1,24	2,73	1,18	1,08
17	0,99	1,72	1,14	1,68	0,85	0,87	0,85	0,97	0,97	0,87	1,27	1,01	0,63	0,96	0,89	1,12	1,62	1,24	1,04
18	0,98	1,35	0,97	1,27	0,82	0,90	0,84	0,95	0,90	0,84	1,47	0,87						1,21	1,19
19	1,01	1,13	1,10	1,13	0,91	0,96	0,92	0,96	0,94	0,78	1,44	0,84	0,75	1,02	0,66	0,41	7,87	1,22	1,12
20	0,99	1,63	1,66	1,57	0,92	0,95	0,93	0,98	0,97	0,77	1,10	0,98	0,54	1,33	1,29	0,61	3,33	1,09	0,72
H	72,04	57,07	74,43	45,95	61,17	54,36	59,21	55,27	53,96	47,85	*	*	*	*	*	*	*	28,92	24,58
p(H)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	*	*	*	*	*	*	*	0,0672	0,1749
N	153	153	153	153	153	153	153	153	153	153	55	55	19	19	19	19	19	64	64

*metoda nije prikladna za ovu grupu uzoraka, objašnjeno u tekstu

4.2.6. Univarijatna korelacija zavisnih varijabli za transplantirane lišajeve

Kod podataka dobivenih za transplantirane lišajeve u daljnjim analizama je korištena samo prva vremenska točka (T1) tri mjeseca nakon transplantacije lišajeva. Skup varijabli vitalnosti lišajeva smanjen je pomoću analize glavnih komponenti (PCA) na četiri glavne komponente, a sve bliske korelacije bile su pozitivne. PCA je pokazala četiri glavne komponente vitalnosti lišajeva za vrstu *F. caperata* koje su objasnile 86,7 % ukupne varijabilnosti, dok su za vrstu *E. prunastri* objasnile 91,2 %. Pritom, za lišaj *F. caperata* prva komponenta (F1; 38,1 % ukupne varijance) predstavlja varijable vezane uz pigmente (TChl, PQa, TCar), druga (F2; 25,1 %) predstavlja NPQ i R_{Fd} , treća (F3; 13,2 %) predstavlja F_v/F_m , a četvrta (F4; 10,3 %) predstavlja q_p (Prilog 9). Za lišaj *E. prunastri* prva komponenta (F1; 41,9 % ukupne varijance) predstavlja varijable vezane uz pigmente (TChl, PQa, TCar), druga (F2; 26,9 %) predstavlja NPQ i R_{Fd} , treća (F3; 12,4 %) predstavlja Q_p i F_v/F_m , a četvrta (F4; 9,9 %) predstavlja Chl *a*/Chl *b* (Prilog 10).

Nakon što je PCA smanjila broj zavisnih varijabli povezanih s vitalnošću lišajeva, generirana je korelacijska matrica zasebno za svaku vrstu u T1. Za rezultate kod vrste *E. prunastri* dobivene su pozitivne korelacije N s Zn, Pb, Cd i F1, dok su negativne korelacije zabilježene s F2 i usninskom kiselinom (Tablica 12). Sumpor (S) također pozitivno korelira s Cd i F1, ali i negativno s F2 i usninskom kiselinom. Za razliku od N, S je pozitivno koreliran i s Ni, V i F3, dok negativno korelira s kloratranorinom. Cd, uz oba nemetala, pozitivno korelira s većinom drugih metala (Ni, Zn, Pb, V). V i Ni pokazuju visoku pozitivnu korelaciju, a također su Pb i Zn pozitivno korelirani. F2 (koji predstavlja NPQ i R_{Fd}), uz N i S, pokazuje i negativnu korelaciju s Cd. F3 (koji predstavlja F_v/F_m i q_p) pozitivno korelira sa S, V i Ni, dok negativno korelira s everničnom kiselinom. S druge strane F4 (koji predstavlja omjer klorofila *a* i *b*) nije koreliran s niti jednom varijablom. Usninska kiselina je, uz N i S, još negativno korelirana sa F1 i everničnom kiselinom, ali pozitivno korelira s Ni i kloratranorinom. Evernična kiselina pokazuje pozitivne korelacije i sa F1 i atranorinom te negativne s Ni, Pb i V. Kloratranorin je pozitivno koreliran s Pb, usninskom kiselinom i atranorinom te dok negativno korelira sa S i Ni.

Za rezultate kod vrste *F. caperata* sam zabilježila pozitivnu korelaciju između S i N. S time da N ima i negativne korelacije s Ni i Pb, dok S ima negativne korelacije s Pb i F3, te dodatne pozitivne i sa Zn, F4 i usninskom kiselinom. F4 (predstavlja q_p) je još pozitivno koreliran s Ni. A usninska kiselina ima pozitivne korelacije i sa Ni, Zn, Pb i protocetraričnom kiselinom. Dok

protocetrarična kiselina ima još pozitivne korelacije s Ni, Pb i V. Neki od metala su pozitivno korelirani, Cd sa Zn i V, a V i sa Pb. F1 (predstavlja varijable pigmenata) i F2 (predstavlja NPQ i R_{Fd}) nisu korelirani niti s jednom varijablom.

Tablica 12 Pearsonovi korelacijski koeficijenti između N, S, Ni, Zn, Cd, Pb, V, faktora vitalnosti lišajeva i sekundarnih metabolita. Podebljano označava $p < 0,05$.

Epru	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	F1	F2	F3	F4	E.kis.	U.kis.	Atra.	Chlor.
N	1,000														
S	0,377	1,000													
Ni	0,027	0,357	1,000												
Zn	0,318	0,045	0,002	1,000											
Cd	0,421	0,345	0,313	0,173	1,000										
Pb	0,200	-0,093	0,056	0,151	0,410	1,000									
V	0,015	0,384	0,855	-0,006	0,298	0,123	1,000								
F1	0,266	0,149	-0,080	0,066	0,032	-0,297	-0,089	1,000							
F2	-0,236	-0,154	0,042	-0,117	-0,212	-0,085	0,075	0,000	1,000						
F3	0,117	0,152	0,168	0,075	0,051	-0,068	0,192	0,000	0,000	1,000					
F4	-0,094	-0,030	0,098	-0,027	-0,040	-0,103	0,058	0,000	0,000	0,000	1,000				
Evernična kis.	-0,083	-0,037	-0,303	-0,116	-0,040	-0,186	-0,279	0,152	0,002	0,004	0,133	1,000			
Usninska kis.	-0,304	-0,252	0,205	-0,133	-0,127	0,041	0,096	-0,215	0,141	-0,050	0,102	-0,167	1,000		
Atranorin	-0,091	-0,060	0,093	-0,073	0,039	0,046	0,017	-0,092	-0,067	-0,187	-0,065	0,235	0,027	1,000	
Kloratranorin	0,087	-0,200	-0,148	-0,021	0,118	0,219	-0,044	0,051	0,047	-0,123	-0,084	0,037	0,411	0,230	1,000
Fcap	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	F1	F2	F3	F4	P.kis.	U.kis.		
N	1,000														
S	0,617	1,000													
Ni	-0,263	-0,033	1,000												
Zn	0,099	0,380	0,107	1,000											
Cd	-0,095	0,118	0,068	0,463	1,000										
Pb	-0,370	-0,409	0,110	-0,008	0,026	1,000									
V	-0,138	0,004	0,064	-0,058	0,313	0,205	1,000								
F1	0,033	-0,128	-0,035	-0,083	-0,030	-0,037	-0,134	1,000							
F2	-0,063	-0,017	-0,020	0,095	0,086	0,051	-0,056	0,000	1,000						
F3	0,077	-0,169	-0,104	-0,089	-0,092	-0,107	-0,114	0,000	0,000	1,000					
F4	0,080	0,219	0,183	0,101	0,009	0,025	0,108	0,000	0,000	0,000	1,000				
Protocetr.kis.	-0,011	0,093	0,223	0,118	-0,033	0,378	0,203	-0,074	0,026	-0,066	0,143	1,000			
Usninska kis.	-0,055	0,195	0,269	0,297	-0,089	0,180	-0,003	0,006	0,094	-0,106	0,062	0,619	1,000		

E. prunastri (Epru), F. caperata (Fcap), N—dušik; S—sumpor; Ni—nikal; Zn—cink; Cd—kadmij; Pb—sadržaj olova; F1, F2, F3, F4—četiri glavne komponente vitalnosti lišajeva; E.kis.- sadržaj evernične kiseline; U.kis.- sadržaj usninske kiseline; Atra. – sadržaj atranorina; Chlor. – sadržaj kloratranorina; P.kis. – sadržaj protocetrarične kiseline

4.2.7. Regresijski modeli za transplantirane lišajeve

Analogno regresijskim modelima za native lišajeve vrste *F. caperata* (vidi poglavlje 4.1.7.), napravljeni su regresijski modeli za transplantirane lišajeve (zasebno za vrste *E. prunastri* i *F. caperata*; Tablica 13), koji su za većinu varijabli imali znatno manju prediktivnu snagu od regresijskih modela za native lišajeve (Tablica 7).

Kod transplantiranih lišajeva vrste *E. prunastri* najviše razine varijabilnosti objašnjene modelom zabilježene su za N_i (45 %) i V (48 %). Brzina vjetra te umnožak brzine vjetra i udaljenosti su pozitivno korelirani, dok je frekvencija vjetra negativno korelirana za obje varijable (N_i i V). Za ostale je zavisne varijable razina objašnjene varijabilnosti sezala do najviše 20 %.

S druge strane, kod transplantiranih lišajeva vrste *F. caperata* se za nemetale (N i S) može ovim modelom objasniti oko jedne polovine varijabilnosti (47 % i 53 %), i oba su pozitivno korelirani s udaljenošću, dok je brzina vjetra negativno korelirana s N , a frekvencija vjetra sa S . S druge strane, pozitivno je korelirana interakcija udaljenosti i frekvencije vjetra s N te interakcija udaljenosti i brzine vjetra sa S . Za V je i kod ove vrste objašnjeno 47 % varijabilnosti s istim značajnim korelacijama kao i kod vrste *E. prunastri*.

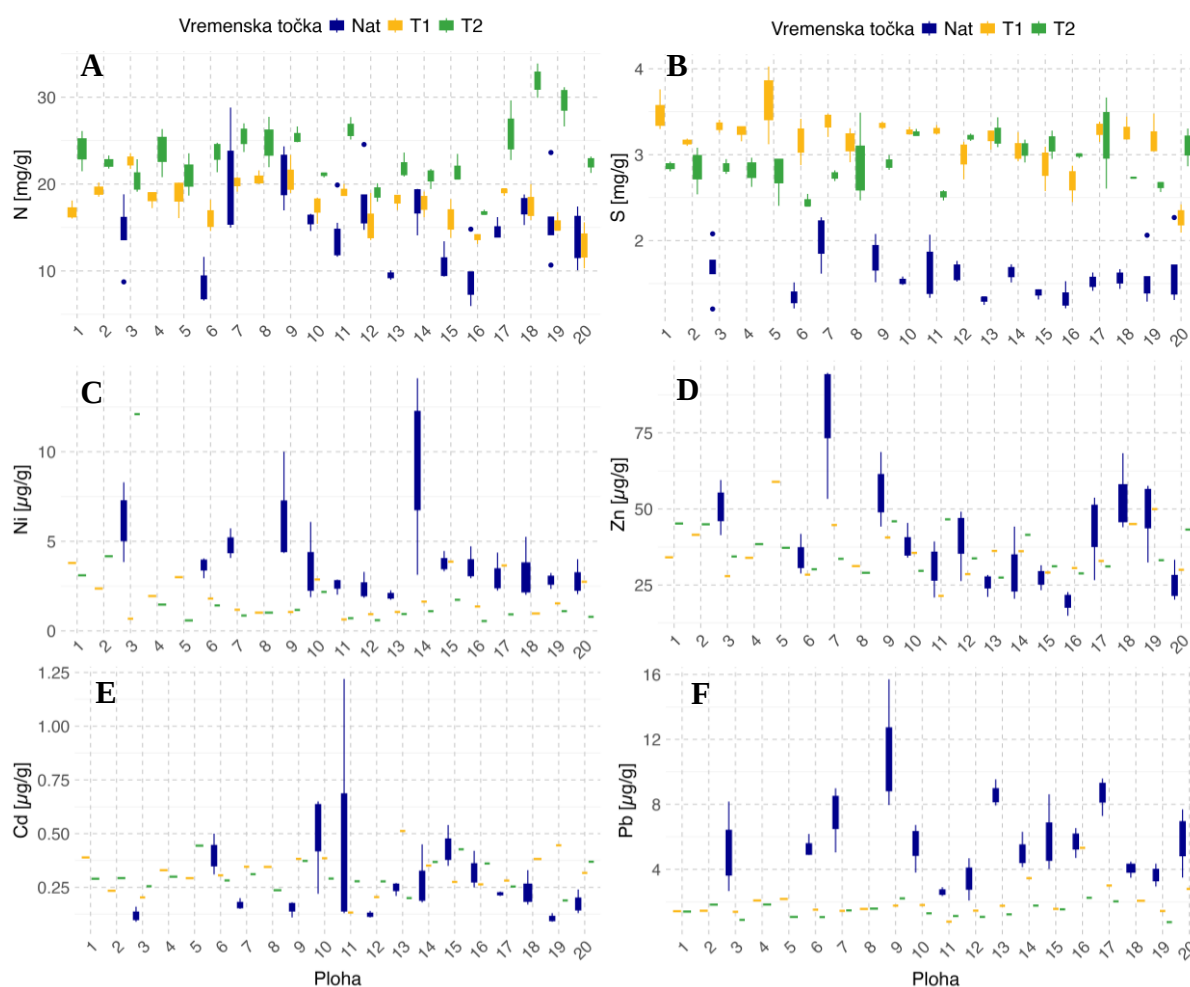
Tablica 13 Rezultati optimiziranih generaliziranih linearnih modela (GLM) koji objašnjavaju faktore vitalnosti lišajeva (vidi Prilog 9, Prilog 10) sadržaj nemetala (S, N), metala (Ni, Zn, Cd, Pb, V) i sekundarnih metabolita kao funkciju različitih okolišnih prediktora: U oba modela korišteno je tri okolišna parametra. Prvi model „Epru“ je za transplantiranu vrstu Evernia prunastri, dok je drugi model „Fcap“ za transplantiranu vrstu Flavoparmelia caperata. Značajni odnosi prikazani su podebljano.

Epru	F1	F2	F3	F4	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	E.kis.	U.kis.	Atra.	Chlor.
R ²	0,05	0,00	0,07	0,06	0,08	0,16	0,45	0,01	0,09	0,09	0,48	0,16	0,20	0,06	0,22
F	4,23	0,69	5,21	7,04	6,46	12,40	49,55	2,40	18,72	6,64	55,70	12,42	15,71	4,64	17,92
p (F)	0,01	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
GLM konstanta	-	n.s.	+	-	+	+	-	n.s.	+	+	-	+	+	+	+
d_ref	+	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	+	n.s.	+
w_frq	+	n.s.	-	n.s.	+	n.s.	-	n.s.	n.s.	+	-	+	n.s.	+	n.s.
w_spd	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	n.s.	+	n.s.	+	-	-	+	-
d_ref*w_frq	+	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+
d_ref*w_spd	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	n.s.
w_frq*w_spd	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.
Fcap	F1	F2	F3	F4	N	S	Ni	Zn	Cd	Pb	V	P.kis.	U.kis.		
R ²	0,08	0,02	0,04	0,23	0,47	0,53	0,32	0,09	0,12	0,26	0,47	0,28	0,09		
F	6,11	2,90	3,62	18,36	53,15	67,00	28,55	7,17	8,76	21,94	54,03	24,58	7,17		
p (F)	0,00	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
GLM konstanta	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
d_ref	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	
w_frq	+	n.s.	n.s.	-	n.s.	+	n.s.	+	+	-	-	+	+	+	
w_spd	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	0,36	+	n.s.	+	n.s.	n.s.	+	
d_ref*w_frq	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	+	
d_ref*w_spd	+	n.s.	+	+	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	+	+	+	
w_frq*w_spd	-	n.s.	-	+	n.s.	n.s.	+	-	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

nezavisne varijable korištene u analizi kao procjenitelji prostornog rasporeda onečišćenja iz rafinerije (uključujući bivarijantne interakcije): (1) udaljenost od istraživačke plohe do rafinerije (d_ref), (2) godišnja učestalost vjetra koji dolazi iz smjera rafinerije (w_frq), (3) godišnja srednja brzina vjetra iz smjera rafinerije (w_spd), N—sadržaj dušika; S—sadržaj sumpora; F1, F2, F3, F4—četiri glavne komponente vitalnosti lišaja; Ni—sadržaj nikala; Zn—sadržaj cinka; Cd—sadržaj kadmija; Pb—sadržaj olova; V—sadržaj vanadija; E.kis.- sadržaj evernične kiseline; U.kis.- sadržaj usninske kiseline; Atra. — sadržaj atranorina; Chlor. — sadržaj kloratranorina; P.kis. — sadržaj protocetrarične kiseline; R²—koeficijent determinacije; F—proporcija objašnjene i neobjašnjene varijabilnosti (F—statistika); p (F)—vjerojatnost F—statistike; n.s.—nema značajnosti; plus (+) označava značajnu pozitivnu korelaciju; minus (−) označava značajnu negativnu korelaciju. Prikazane su samo nezavisne varijable koje su bile značajni procjenitelji (na razini vjerojatnosti p = 0,05) za barem jednu zavisnu varijablu.

4.3. Usporedba bioakumulacije nativnih i transplantiranih lišajeva

Usporedba bioakumulacije između nativnih i transplantiranih lišajeva učinjena je samo za vrstu *F. caperata* (za koju su postojali i nativni i transplantirani uzorci), pri čemu su za tu usporedbu korišteni izvorni podaci mjerenja (bez normalizacije). Kada se pogledaju podaci za nemetale, vidljivo je kako su generalno koncentracije N i S veće u transplantiranim uzorcima, što je posebno izraženo za S (Slika 41). Pri tome su za N najviše vrijednosti u T2, dok je kod S na plohama bliže rafineriji (prvih 10) obrnut slučaj. S druge strane, bioakumulacija metala je generalno viša u nativnim uzorcima, što je najviše izraženo za Pb, a najmanje za Cd.



Slika 41 Box-Whisker dijagrami prikazuju sadržaj nemetala (A, S – sumpor; B, N – dušik) u mg/g i metala (C, Ni – nikal; D, Zn – cink; E, Cd – kadmij; F, Pb – olovo) u µg/g suhe tvari u uzorcima vrste *Flavoparmelia caperata*, nativni (Nat) te transplantirani i uzorkovani nakon 3 mjeseca izlaganja (T1) i 7 mjeseci izlaganja (T2). Plohe su raspoređene od najbliže do najdalje rafineriji. „Box“ – interkvartilni raspon (IQR), „whisker“ – minimum-maksimum (do 1,5 puta IQR), točke – vrijednosti veće od 1,5 IQR.

5. RASPRAVA

5.1. *Nativni lišajevi*

Nalazi na području Slavanskog Broda ukazuju na alarmantno stanje poznato kao „lišajna pustinja“ unutar dviju istraživačkih ploha koje se nalaze u blizini rafinerije, na udaljenosti manjoj od 2 km, gdje nisam pronašla niti jednu vrstu lišaja na stablima. Ovaj se fenomen obično povezuje s visokim razinama SO_2 koji, uz NO_x , predstavljaju glavni uzrok toksične acidifikacije (Hawksworth, 1970). Hawksworth i Rose (1970) razvili su ljestvicu koja opisuje promjene u zajednicama epifitskih lišajeva u odnosu na koncentracije SO_2 , koja se pokazala robusnom u kasnijim istraživanjima (Nash III, 2008). Ova ljestvica ukazuje na to da lišajevi ne mogu preživjeti u okruženjima gdje koncentracije SO_2 prelaze $150 \mu\text{g m}^{-3}$, dok osjetljive vrste poput *Flavoparmelia caperata* nestaju pri razinama SO_2 višim od $50 \mu\text{g m}^{-3}$. Budući da nije nađena niti jedna vrsta lišaja to sugerira da su razine SO_2 u područjima najbližim rafineriji vjerojatno iznad ovog praga. Naime, Jeričević i sur. (2019) su pokazali da su mjerne postaje zabilježile visoke satne koncentracije SO_2 , u rasponu od 300 do $820 \mu\text{g m}^{-3}$, osobito tijekom stabilnih uvjeta atmosferskog inverzijskog sloja (SABL), koji potiču akumulaciju onečišćujućih tvari. Iako su poboljšanja u regulativama i smanjenje koncentracija onečišćujućih tvari doveli do ponovne kolonizacije „lišajnih pustinja“ u mnogim urbanim i industrijskim područjima (Munzi i sur., 2007; Seaward, 1997), ovo istraživanje ukazuje na nastavak zabrinjavajućeg utjecaja onečišćenja zraka na području Slavanskog Broda. Mogu pretpostaviti kako i druge onečišćujuće tvari iz rafinerije, poput teških metala, kumulativno, uz SO_2 , pridonose nastanku „lišajne pustinje“. Poznato je da depozicija zakiseljene vode koja sadrži teške metale može značajno smanjiti preživljavanje lišajeva; na primjer, za lišaj *Bryoria fuscescens* kritično toksična koncentracija Ni bila je $> 7 \mu\text{g/g}$ u kiselim uvjetima, a skoro tri puta veća ($> 20 \mu\text{g g}^{-1}$) pri neutralnim uvjetima (Conti i Cecchetti, 2001). Na te dvije plohe gdje nisu pronađeni lišajevi, uzorkovala sam koru kako bih izmjerila koncentracije metala i nemetala i potvrdila mogući uzrok. Koncentracije Cd i Zn na plohi 1 bili su viši od svih zabilježenih vrijednosti kod lišajeva, dok je viša koncentracija Ni u kori u odnosu na one u lišajevima zabilježena za obje plohe. Uzevši u obzir da su istraživanja, koja su uspoređivala bioakumulaciju kore i lišajeva, pokazala da kora ima redovito niže koncentracije metala od lišajeva u istim uvjetima (Baptista i sur., 2008; Lippo i sur., 1995), možemo zaključiti kako bi te koncentracije u lišajevima bile i više, kada bi lišaji mogli preživjeti onečišćenje u najbližem pojasu oko rafinerije. Stoga mogu zaključiti da su upravo teški metali, uz zakiseljavanje,

odgovorni za nestanak lišajeva na užem području oko području rafinerije. Također, to pokazuje kako je zrak na tom području opasan i za druge organizme.

Vrijednosti parametara fluorescencije klorofila *a* mogu se donekle razlikovati između vrsta, stoga je potrebno pažljivo uspoređivati rezultate dobivene za plohe na kojima je sakupljena vrsta *F. caperata* s onima gdje je sakupljena vrsta *P. sulcata*. Međutim, poznato je kako zdravi lišajevi većine vrsta imaju vrijednosti F_v/F_m 0,6 – 0,7, pa su slične vrijednosti zabilježene i ranije za ove dvije vrste (Maslač i sur., 2016). U ovom radu sve su zabilježene srednje vrijednosti iznad 0,65, izuzev kod plohe 16. Potencijalno objašnjenje za nižu vrijednost izmjerenu kod ove plohe je prorjeđivanje šume (tzv. „naplodni sijek“) 2012. godine ispred te plohe, a zatim i potpuno uklanjanje šume (tzv. „završni sijek“) (2014. godine) (Vesna Andrić, osobna komunikacija). Stoga je za očekivati da je ova reakcija fotosintetskog aparata, ali i nekih drugih parametara (chl *a*, chl *b*, TChl, N, S) prvenstveno uzorkovana promjenama u mikroklimi kao što su veća količina svjetla i manje vlage. Za ovaj je parametar u literaturi zabilježeno kako se snižava, s obzirom na onečišćenje, npr. kod lišaja *Ramalina lacera* zabilježen je pad vrijednosti F_v/F_m , kod uzoraka koji sadrži povišene vrijednosti metala Ba, Ni, S, V i Zn nakon izloženosti antropogenom onečišćenju (Garty i sur., 2000). Općenito gledajući, pokazatelj, F_v/F_m koliko god se često koristi i preporuča kao dobar pokazatelj stresa (Karakoti i sur., 2014; Munzi i sur., 2013), ovdje se nije pokazao kao dovoljno osjetljiv. Slično je već zabilježeno u nekoliko radova, koji su pokazali da je za određivanje razine onečišćenja zraka osjetljiviji parametar bioakumulacija metala (Yemets i sur., 2014) ili pak integritet membrana mikobionta (Yemets i sur., 2015). U ovom su radu stoga korišteni i drugi parametri fluorescencije klorofila *a* kao što su NPQ i R_{Fd} koji su do sada rijetko analizirani u istraživanjima onečišćenja zraka, a ovdje su se pokazali kao osjetljiviji pokazatelji.

U slučaju nativnih lišajeva, unatoč značajnim razlikama između ploha (Tablica 5), nisu se pokazale razlike koje se mogu jednoznačno dovesti u vezu s udaljenosti od rafinerije odnosno jačim onečišćenjem bliže rafineriji. Za većinu zavisnih varijabli, najviši ili najniži rezultati su zabilježeni na plohama 7-9, koje su udaljene 5 km od rafinerije. Tako su prije spomenuti parametri NPQ i R_{Fd} , koji su se nakon provedene PCA grupirali zajedno u faktor F2, pokazali snižene vrijednosti na tim plohama što ukazuje na smanjenje fotosintetske učinkovitosti. Naime, parametar R_{Fd} mjereno u uvjetima svjetlosnog zasićenja u izravnoj je korelaciji sa stopom asimilacije CO₂ (Lichtenthaler i sur. 2005). S druge strane, za parametre vitalnosti lišajeva vezane uz fotosintetske pigmente (grupirani u F1), ali i uz bioakumulaciju N i S, upravo na tim plohama su bilježene najviše vrijednosti. Plohe 7-9 su smještene u ili oko grada, gdje bi

cestovni promet i kućna ložišta mogli značajno doprinijeti povećanim razinama onečišćujućih tvari kao što su dušikovi oksidi, sumporov dioksid i teški metali. Također, te se plohe, za razliku od plohe 6 koja je na sličnoj udaljenosti od rafinerije, nalaze u prevladavajućem smjeru vjetra koji dolazi iz smjera rafinerije (Slika 5). Na tim plohama (7-9), sadržaj dušika u lišajevima premašio je 20 mg/g suhe mase (čak 30 mg/g u vrsti *P. sulcata* na plohi 8), što je usporedivo s razinama dušika zabilježenim u uzorcima *F. caperata* uzorkovanim na farmama svinja gdje je okoliš obogaćen dušikom (Fratini i sur., 2007). Ochoa-Hueso i Manrique (2011) pokazali su da čak i skromno povećanje dostupnosti dušika, koje se često nalazi u urbanim i poljoprivrednim sredinama, može dovesti do većeg sadržaja klorofila *a* u lišaju *Cladonia foliacea*, bez da istovremeno dođe do poboljšanja fotosintetske aktivnosti. Suprotno tome, pretjerano visoke koncentracije dušika povezane su sa smanjenjem sadržaja pigmenata i vrijednosti parametara fluorescencije klorofila, osobito kod osjetljivih epifitskih vrsta kao što je *F. caperata* (Hauck, 2010; Paoli i sur., 2015b, 2015c).

Ovim je istraživanjem zabilježena pozitivna korelacija između sadržaja dušika i sadržaja pigmenata (F_1) te parametra F_v/F_m (F_4), što sugerira da povećane razine dušika mogu potaknuti lišajeve da prilagode svoj metabolizam i iskoriste višak dušika kako bi povećali sintezu pigmenata, dok god razine dušika nisu toliko visoke da imaju negativne učinke na fotosintezu i metabolizam pigmenata. Ovaj je fenomen dokumentiran kod različitih vrsta lišajeva i eksperimentalnih postavki, a neki istraživači ga nazivaju „fertilizirajućim učinkom“ (Munzi i sur., 2023). S obzirom na to da je ovdje riječ o nativnim lišajevima koji su u ovom okruženju uspijevali preživjeti dugi niz godina, može se pretpostaviti da su svoje metaboličke procese prilagodili višim razinama dušika. Međutim, složena veza između dušika—bitnog, ali potencijalno štetnog elementa—i vitalnosti lišajeva predstavlja izazov za tumačenje, s obzirom na to da dušik značajno utječe na fotobionte lišajeva u pogledu proizvodnje klorofila i sinteze proteina fotosustava (Gauslaa i sur., 2021). Također, moguće je da negativni učinak visoke koncentracije N bude smanjen dostupnošću drugih esencijalnih mineralnih hranjivih tvari (Gauslaa i sur., 2021).

Sadržaj sumpora u uzorcima lišajeva u ovom radu je nešto viši od ranije zabilježenog u lišaju *Ramalina celastri* u blizini industrije (do 1,17 mg/g) (Mateos i González, 2016), vjerojatno zbog toga što se radi o različitoj vrsti lišaja. Prema literaturi (Wadleigh, 2003), za očekivati je da će koncentracije sumpora u lišajevima korelirati s onečišćenjem sumporom iz rafinerije, što je ovdje i slučaj. Fotosintetska učinkovitost općenito se smanjuje uslijed prisutnosti povišene koncentracije sumpora (Deltoro i sur., 1999), što je u skladu s mojim rezultatima koji pokazuju

postojanje negativne korelacije između sumpora i F2 te F3, parametara fluorescencije klorofila, koji predstavljaju fotosintetsku aktivnost. Ipak, F3 je bio negativno koreliran sa sadržajem Pb i Zn, što također može značiti da su i ti teški metali doprinijeli smanjenju fotosintetske aktivnosti. Poznato je da određeni metali smanjuju učinkovitost fotosintetskog aparata (Karakoti i sur., 2014), kao i koncentracije fotosintetskih pigmenata (Rola i sur., 2019), iako ovaj učinak ovisi o vrsti lišaja. Na primjer, povećane koncentracije Zn, Cd, Cu, i Ni u vrsti *Diploschistes muscorum* te Zn i Ni u vrsti *Cladonia rei* smanjile su sadržaj fotosintetskih pigmenata, dok su koncentracije Pb imale pozitivan učinak na obje vrste lišajeva (Rola i sur., 2019). Ipak, treba uzeti u obzir da je navedeno istraživanje provedeno na terikolnim pionirskim vrstama, koje su potencijalno tolerantnije na Pb od epifitskih vrsta istraživanih u ovoj disertaciji. Neočekivano sam zabilježila pozitivnu korelaciju između Ni, Zn i Pb te varijabli pigmenata (F1). Suprotno tome, u uzorcima *F. caperata* iz urbanog područja Kalkute u Indiji sadržaj Pb bio je negativno povezan sa sadržajem klorofila *a* (Chl *a*), omjerom Chl *a/b* i PQa vrijednosti (Majumder i sur., 2013). Budući da sam utvrdila pozitivne korelacije između akumuliranih razina N, S, Ni i Zn, što se može objasniti njihovim zajedničkim izvorom onečišćenja, možemo pretpostaviti da naš model objašnjava uzorke koji se nalaze u onom dijelu raspona učinaka gdje dušik potiče sintezu pigmenata, ali gdje povišeni sumpor i teški metali još uvijek nisu u dovoljnim koncentracijama da su vidljivo štetni za metabolizam pigmenata. Osim toga, utvrđeno je da lišajevi koji prirodno rastu na jako onečišćenim mjestima imaju viši sadržaj pigmenata kao prilagodbu na onečišćenje zraka (von Arb i sur., 1990). Unatoč zabilježenim značajnim razlikama između ploha (Tablica 5) te zabilježenim značajnim negativnim korelacijama s bioakumulacijom N, Ni, Cd i Pb (Tablica 6), smatram da se sekundarni metaboliti u lišajevima nisu pokazali kao jasan pokazatelj onečišćenja zraka. Do sličnog zaključka došli su i Gauslaa i sur. (2016), koji su analizirali sekundarne metabolite četiri vrste lišaja (*Ramalina farinacea*, *Usnea dasypoga*, *Parmelia sulcata*, *Lobaria pulmonaria*) u kontekstu udaljenosti od autoceste i koncentracije teških metala.

Klasifikacija bioakumulacije metala razvijena je od strane Cecconi i sur. (2019), uzimajući u obzir rezultate vrijednosti bioakumulacije metala koje su proizašle iz brojnih studija onečišćenja u Italiji, uključujući i one koje se fokusiraju na rafinerije nafte. Rafinerije nafte prepoznate su kao značajni izvori onečišćenja teškim metalima As, Mo, Ni, Se, V, Pb (Ragothaman i Anderson, 2017), pri čemu se Ni i V smatraju markerima za industrije koje sagorijevaju naftu i/ili rafiniraju naftu (Celo i Dabek-Zlotorzynska, 2010). Od faze ukidanja olovnog benzina (u Hrvatskoj 2006., a u Bosni i Hercegovini 2010.), koja je značajno smanjila

njegove emisije, danas su glavni izvori onečišćenja zraka s Pb obrada metala i ruda, olovno gorivo iz aviona, te emisije iz proizvodnje baterija, sagorijevanja ugljena, lijevanja i starih objekata, pri čemu su najviše razine Pb zabilježene u blizini ljevaonica (Zhang i sur., 2015). Ipak, pokazalo se da povijesni izvori Pb porijeklom iz benzina ostaje važan izvor Pb zbog svoje postojanosti i učinkovite remobilizacije (Resongles i sur., 2021). Od četiri analizirana teška metala u nativnim lišajevima (Ni, Zn, Cd, Pb), u ovom sam istraživanju zabilježila „vrlo visoku“ i „visoku“ bioakumulaciju Ni u blizini rafinerije te u sjeveroistočnom smjeru, odnosno dominantnom smjeru vjetrova iz rafinerije, dok je za Pb „visoka“ bioakumulacija zabilježena na plohi 9, u centru grada Slavenskog Broda i u dominantnom smjeru vjetrova, te plohami 13 i 17 koje se nalaze južno od autoceste, tj. sjeverozapadno od rafinerije, na oko 10 km. Međutim, ove visoke klase bioakumulacije nisu zabilježene na plohi 7, koja se nalazi uz službenu mjernu postaju, što bi moglo upućivati na pretpostavku da mjerenja koncentracija ovih spojeva s dotične službene mjerne postaje nisu reprezentativna za ove elemente na prostoru Slavenskog Broda. Naime nešto malo manje od godinu dana prije uzorkovanja nativnih lišajeva (1.1.2015.) su započela mjerenja Ni, Cd i Pb u PM₁₀ na mjernoj stanici Slavonski Brod-1. Za te je metale zakonski određena granična vrijednost granicu, koja se određuje prema godišnjem prosjeku (20 ng m⁻³, 5 ng m⁻³, 0,5 µg m⁻³). Prema godišnjem izvješću, granične vrijednosti nisu prekoračene, stoga je kvaliteta zraka prema tim onečišćujućim tvarima ocijenjena kao I. kategorije, odnosno, zrak je čist ili neznatno onečišćen (Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, 2016). Ipak, detaljnijom analizom podataka koje sam prikupila s online portala Kvaliteta zraka u Republici Hrvatskoj (MZOZT, 2024), može se uočiti kako se godišnja granica za Ni više puta prekoračila tijekom godine; međutim, gledajući samo godišnji prosjek, on je bio ispod praga (Prilog 11). U ovom kontekstu, mogu zaključiti kako lišajevi pružaju točniji prikaz utjecaja onečišćenja na organizme, omogućujući nam kritičku reevaluaciju valjanosti godišnjih srednjih granica. Ovo je posebno relevantno za područja poput Slavenskog Broda, gdje sezonske varijacije mogu značajno utjecati na dinamiku onečišćenja te se sagledavanjem samo godišnjih srednjih vrijednosti lako može podcijeniti značajan negativan utjecaj na ekosustav i zdravlje ljudi.

5.2. Transplantirani lišajevi

Obje transplantirane vrste su već u prvoj vremenskoj točki pokazale diskoloraciju odnosno blijedenje talusa, na plohama 1 i 2, do 2 km od rafinerije nafte. Diskoloracija je dokumentirani efekt u literaturi, koji se povezuje s onečišćenjem zraka, primjerice kod vrste *F. caperata* u urbanim sredinama (Baptista i sur., 2008) ili u blizini odlagališta otpada (Paoli i sur., 2015a). González i Pignata (2000) tvrde kako je to posljedica razgradnje molekula klorofila te da je degradacija klorofila generalno pozitivno povezana s intenzitetom onečišćenja. Međutim, simptomi oštećenja staničnih membrana bilo mikobionta ili fotobiontskog partnera, ili oboje, mogu se detektirati dugo prije nego što postanu vidljivi znakovi oštećenja u klorofilu fotobionta (Garty i sur., 1993). U slučaju ovog istraživanja, na tim su plohama uzorci *F. caperata* u T1 pokazali najveći pad koncentracije pigmenata te kvocijenta feofitinizacije, a najviše upravo na plohi 1 (na oko 0,65 od kontrolne vrijednosti) (Tablica 8). S druge strane kod vrste *E. prunastri* to se dogodilo na plohi 2 u T1 (na oko 0,45 od kontrolne vrijednosti) (Tablica 10). Zanimljivo je kako je u T2, za obje vrste, došlo do porasta vrijednosti (Tablica 9, Tablica 11). Navedeno se potencijalno može objasniti nekom vrstom prilagodbe na postojeće stanje, nakon početne snažnije negativne reakcije na onečišćenje.

Najsnažniji zabilježeni utjecaj rafinerije nafte na transplantirane lišajeve je bioakumulacija teških metala, gdje se posebno ističu Ni i V, poznati kao tipični pokazatelji onečišćenja iz rafinerija (Celo i Dabek-Zlotorzynska, 2010). Slični rezultati dobiveni su i u drugim istraživanjima na lišajevima (Brunialti i Frati, 2014; Conti i Cecchetti, 2001). Na dvije najbliže plohe (do 2 km od rafinerije), koncentracije Ni i V su bile ekstremno visoke, daleko iznad svih prijašnjih zabilježenih razina u literaturi. Naime, ovi su metali zabilježeni u koncentracijama 50 do 100 puta višim od kontrole na plohama 1 i 2, dok su dosadašnja istraživanja pokazala maksimalno 4,2 puta višu koncentraciju za V i 3,38 za Ni (Cecconi i sur., 2019). Dodatno, prema korištenoj skali, i na ostalim plohama zabilježena je „vrlo visoka” bioakumulacija već u T1; za Ni se na svim plohama povećala više od 3,7 puta (granica za kategoriju „vrlo visoka” bioakumulacija), dok je za V ova vrijednost također premašila 3,7 puta na polovini istraživanih ploha. U T2 su za Ni sve plohe s „vrlo visokom” bioakumulacijom, a za V gotovo sve. Ovo ukazuje na to da se ti teški metali šire u visokim koncentracijama na širem području oko rafinerije nafte.

Osim za Ni i V, „visoka” i „vrlo visoka” bioakumulacija metala na području istraživanja zabilježena je još i za Mo, Cr, Co, Fe, Zn, Cd i Mn. Dok se Mo, Cr, Co i Fe mogu dovesti u

vezu s onečišćenjem iz rafinerije jer su visoke koncentracije zabilježene na najbliže dvije plohe, Mn ima „vrlo visoku“ i „visoku“ bioakumulaciju na ploham 12 i 15 u T1 te 10, 12-15 i 19 u T2, ali ne i u blizini rafinerije, ukazujući na drugi izvor onečišćenja zraka. Glavni izvor Mn u kontekstu onečišćenja zraka uključuju emisije iz proizvodnje legura, čelika i željeza, izgaranje fosilnih goriva te, u manjoj mjeri, emisije iz izgaranja aditiva za gorivo (Howe i sur., 2004). Stoga je moguće da je izvor Mn u industriji koja postoji unutar Slavenskog Broda (MZOZT, 2025), gdje je zabilježena proizvodnja različitih metalnih konstrukcija, motornih vozila, ali i lijevanje željeza i lakih metala. Zanimljivo je kako Mn nije u tom slučaju povišen na ploham 7-9, koje se nalaze na bližim lokacijama toj industriji. S druge strane, za Zn je samo jedna ploha (7) imala „vrlo visoku“ bioakumulaciju i to u obje vremenske točke. Pretpostavljam da je to onečišćenje vrlo lokaliziranog, ali nepoznatog, karaktera. Također, za Cd „visoka“ (ploha 8) i „vrlo visoka“ (ploha 20) bioakumulacija zabilježena samo za T2 nema neko potencijalno jasno objašnjenje, stoga također zaključujem kako je riječ o jako lokaliziranom onečišćenju.

Posebno je zanimljivo kako ploha 19, na skoro 20 km od rafinerije nafte, u T1 ima „vrlo visoku“ bioakumulaciju samo za Ni (kao i sve istraživane plohe), dok u T2 ta ploha ima najviše metala u klasi „vrlo visoka“ bioakumulacija, odnosno ista je utvrđena za Ni, V, Cr, Mn, Fe i Co. Analizirajući bazu podataka izvora onečišćenja (MZOZT, 2025), pronašla sam kako se na 5-7 km u Oriovcu i Lužanima nalaze proizvodnje koje su potencijalni izvori ovakvog onečišćenja: proizvodnja boja, lakova i sličnih premaza, grafičkih boja i kitova, proizvodnja parnih kotlova, proizvodnja ostalih kemijskih proizvoda.

Što se tiče vremena izlaganja i bioakumulacije teških metala, očekivano se koncentracije povećavaju s duljinom izlaganja, posebno kada se gleda vrsta *E. prunastri* (Slika 33), za koju imam veći broj replika te se češće koristi kao transplantat, pa sam se fokusirala na rezultate koji se odnose na tu vrstu. Paoli i sur. (2018b) tvrde kako se za transplantirane lišajeve preporučuje relativno kratko vrijeme izloženosti (npr. 1-3 mjeseca), što najčešće i jest slučaj u istraživanjima, stoga je i razvijena skala bioakumulacije do 12 tjedana (Cecconi i sur., 2019). I ovim je istraživanjem potvrđeno kako se najbitniji zaključci vezani uz bioakumulaciju iz rafinerije nafte mogu donijeti već nakon 3 mjeseca. Iako postoje radovi koji tvrde kako akumulacija metala ne ovisi o klimatskim faktorima, odnosno periodu godine (npr. Baptista i sur., 2008), smatram da je prilikom planiranja postavljanja eksperimenta potrebno napraviti analizu postojećih podataka s mjernih postaja (ukoliko postoje) kako bi se utvrdio period kada se može očekivati najveće onečišćenje, što je u ovom slučaju bila zima (Jeričević et al., 2019).

Nemetali nisu pokazali toliko izraženu bioakumulaciju, kao što je to zabilježeno kod metala. Dušik generalno ima najviše vrijednosti na plohama 7-9, unutar grada Slavonskog Broda te u dominantnom smjeru vjetra iz rafinerije nafte (Slika 40), ukazujući na činjenicu kako su kućna ložišta i promet potencijalno značajniji izvori emisija dušikovih spojeva od obližnje rafinerije, kao što je indicirano i prethodnim geofizičkim istraživanjem (Jeričević i sur., 2019). Za vrstu *E. prunastri* u T1, slično kao i kod nativnih lišajeva, pokazala se pozitivna korelacija između N i F1 (predstavlja fotosintetske pigmente) ukazujući na „efekt fertilizacije“ (Ochoa-Hueso i Manrique, 2011). Poseban je porast N izražen u T2 kod vrste *F. caperata* na plohama koje su najudaljenije od rafinerije (17-19), stoga možemo pretpostaviti da je tu riječ o utjecaju fertilizacije s poljoprivrednih površina ili farmi purana (MZOZT, 2025), koje se nalaze u okolini upravo tih ploha. Već je bilo spomenuto da farme na kojima se ekstenzivno uzgajaju životinje mogu značajno doprinijeti povećanju koncentracije dušikovim oksidima u atmosferi (Fрати i sur., 2007).

Sumpor nije toliko povišen spram kontrole te je do bioakumulacije u T1 za vrstu *E. prunastri* prvenstveno došlo na plohi 1 (najbližoj plohi rafineriji), dok su u T2 najviše vrijednosti na drugim plohama. Na to je potencijalno mogao utjecati period godine, s obzirom da je poznato kako je na području Slavonskog Broda onečišćenje sumpornim spojevima iz rafinerije nafte izraženije u zimskom periodu (Jeričević i sur., 2019).

Generalno, kod transplantiranih lišajeva pokazatelji vitalnosti lišaja nisu pokazali jasne razlike koje se mogu lako dovesti u vezu s onečišćenjem iz rafinerije nafte, izuzev gore spomenutog pada koncentracije pigmenata i kvocijenta feofitinizacije u T1, koji se potencijalno može povezati s diskoloracijom. To je u skladu s rezultatima dobivenim na vrsti *E. prunastri* izloženoj šest mjeseci na različitim lokacijama u Bratislavi, gdje nije došlo do promjena u fiziologiji, odnosno sadržaju fotosintetskih pigmenata i kvocijentu feofitinizacije (Lackovićová i sur., 2013). Kao što sam ustvrdila kod nativnih uzoraka, pokazatelj F_v/F_m , koliko se god često koristi i preporuča kao dobar pokazatelj stresa (Karakoti i sur., 2014; Munzi i sur., 2013), ovdje se nije pokazao kao dovoljno osjetljiv, unatoč tome što na nekim plohama imamo ekstremno visoke koncentracije teških metala. Slično je već zabilježeno u nekoliko radova, koji su pokazali da je za određivanje razine onečišćenja zraka osjetljiviji parametar bioakumulacija metala (Yemets i sur., 2014) ili pak integritet membrana mikobionta (Yemets i sur., 2015).

Kod sekundarnih metabolita, kada se pogledaju značajne razlike između ploha (Tablice 8 – 11), mogu zaključiti kako generalno nema značajnih razlika, a tamo gdje i postoje npr. za vrstu

F. caperata protocetrarična kiselina u T1, a za vrstu *E. prunastri* usninska kiselina u T2, to se teško može povezati s utjecajem onečišćujućih tvari, unatoč zabilježenim korelacijama (Tablica 12). Usprkos radovima koji tvrde da postoje razlike u sadržaju sekundarnih metabolita povezane s onečišćenjem, a posebno teškim metalima gdje se čak spominju i određeni mehanizmi interakcije (Białońska i Dayan, 2005; Maslać i sur., 2016; Paoli i sur., 2015c; Pawlik-Skowrońska i Bačkor, 2011; Valencia-Islas i sur., 2007), na temelju dobivenih rezultata u ovom radu smatram da sekundarni metaboliti u lišajevima nisu dobar pokazatelj onečišćenja zraka. Do sličnog zaključka došli su i Gauslaa i sur. (2016), koji su analizirali sekundarne metabolite četiri vrste lišaja (*Ramalina farinacea*, *Usnea dasypoga*, *Parmelia sulcata*, *Lobaria pulmonaria*) u kontekstu udaljenosti od autoceste i koncentracije teških metala.

5.3. Usporedba nativnih i transplantiranih lišajeva

Malobrojna su istraživanja koja su na istom području i u istom vremenskom intervalu komparativno obuhvatila i native i transplantirane lišajeve, odnosno kombinirane tehnike (Abas, 2021). Međutim, na području Slavenskog Broda ograničavanjem istraživanja samo na native lišajeve, izgubile bi se vrijedne informacije koje su prikupljene s transplantiranim lišajevima, prvenstveno za dvije najbliže plohe rafineriji, na kojima nije bilo nativnih lišajeva. S druge strane, nativni lišajevi su pružili vrijedne informacije, jer njihov izostanak s ploha najbližih rafineriji govori o značajnom onečišćenju dok su rezultati analiziranih parametara na ostalim plohama bliže rafineriji dali uvid u prilagodbe preživjelih organizama na dugotrajnu izloženost onečišćenju.

„Lišajna pustinja“, odnosno odsustvo nativnih lišajeva, u područjima najbližim rafineriji je vrlo vjerojatno uzrokovana značajnim onečišćenjem teškim metalima budući da su ekstremno visoke vrijednosti teških metala izmjerene u lišajevima transplantiranim u to područje. Teški metali su još toksičniji za lišajeve kad je prisutno zakiseljavanje (Conti i Cecchetti, 2001), čemu u ovom slučaju doprinose dušikovi i sumporni spojevi iz rafinerije, koji su se također akumulirali u transplantiranim lišajevima. Ovdje je prednost pristupa korištenja transplantiranih lišajeva upravo u utvrđivanju koji su se metali i u kojoj koncentraciji akumulirali u lišajevima kada imamo područja na kojima nema nativnih lišajeva (Cecconi i sur., 2019).

Uglavnom se očekuje da nativni lišaji akumuliraju više teških metala, što je vidljivo i iz skale bioakumulacije, odnosno iz B i EU omjera (Cecconi i sur. 2019). To je i potvrđeno ovim istraživanjem jer je bioakumulacija Ni, Zn, Cd i Pb generalno bila viša u nativnim uzorcima, (Slika 41). Uspoređujući bioakumulaciju između nativnih i transplantiranih lišajeva, uzela sam u obzir samo vrstu *F. caperata* koja je skupljena i kao nativni i kao transplantirani uzorak, s obzirom na to da je poznato kako razine bioakumulacije mogu ovisiti i o vrsti (Cecconi i sur., 2019). Cecconi i sur. (2019) bilježe kako su transplantirani lišajevi izloženi novim, često stresnim okolišnim uvjetima tijekom nekoliko tjedana, zbog čega brzo akumuliraju metale, i to većinom kroz pasivne mehanizme. S druge strane bioakumulacija u nativnim lišajevima, koji su izloženi onečišćujućim tvarima duže vrijeme, najčešće je rezultat dugoročnog međudjelovanja između pasivnih procesa i sporijih aktivnih intracelularnih prijenosa, karakteriziranih specifičnom kinetikom pojedinih elemenata. Ova interakcija kod nativnih lišajeva na kraju dovodi do postizanja dinamičke ravnoteže s okolišem i vjerojatno do viših

razina bioakumulacije elemenata u slučaju značajnih opterećenja onečišćujućim tvarima. Zanimljivo je kako su u slučaju nemetala N i S transplantirani lišajevi imali više vrijednosti od nativnih, sa značajnijom razlikom kod sumpora koji je najviše vrijednosti imao u T1, odnosno u zimi kada je na području Slavanskog Broda onečišćenje sumpornim spojevima izraženije (Jeričević i sur., 2019). Stoga je moguće kako je u tom periodu bioakumulirano više S, što se zatim do kraja drugog perioda izlaganja (T2) djelomično otpustilo. Koncentracije N u T1 su za većinu ploha slične i za nativne i za transplantirane lišajeve, međutim u T2 transplantirani lišajevi su imali značajno više koncentracije N i to na plohama koje su najudaljenije od rafinerije pa možemo pretpostaviti da je tu riječ o utjecaju fertilizacije s poljoprivrednih površina ili farmi purana (MZOZT, 2025) koje se nalaze u okolici upravo tih ploha. Već je bilo spomenuto da farme na kojima se ekstenzivno uzgajaju životinje mogu značajno doprinijeti povećanju koncentracije dušikovih oksida u atmosferi (Fрати i sur., 2007).

Generalno, parametri za vitalnost lišaja kod transplantiranih lišajeva nisu pokazali toliko velike razlike između ploha, kao što je to zabilježeno kod nativnih lišajeva. Vjerojatno je riječ o višegodišnjoj prilagodbi lišajeva koji žive na širem području Slavanskog broda. Sekundarni metaboliti nisu se pokazali kao adekvatan parametar za biomonitoring kvalitete zraka niti kod nativnih, niti kod transplantiranih lišajeva.

5.4. Prostorna i okolišna varijabilnost

5.4.1. Nativni lišajevi

Rezultati dobiveni regresijskom analizom ukazali su na složene međuzavisnosti više okolišnih čimbenika koji zajedno utječu na vitalnost lišajeva, bioakumulaciju i sekundarne metabolite. Unatoč tome, udaljenost od rafinerije ipak je pokazivala negativnu korelaciju s većinom varijabli vitalnosti i bioakumulacije lišajeva u oba modela (Tablica 7). To se poklapa s očekivanjima; kako se udaljenost od izvora onečišćenja povećava, potencijal izloženosti štetnim onečišćujućim tvarima se smanjuje, što dovodi do manje bioakumulacije i posljedično veće vitalnosti lišajeva. Pozitivne korelacije udaljenosti s varijablama F3 (označava q_p) i F4 (označava F_v/F_m), zabilježene u Modelu A, također su očekivane, jer se očekuje da će te vrijednosti biti niže kada je fiziološki stres (u ovom slučaju kao posljedica izloženosti onečišćenju) veći (Gauslaa i sur., 2021; Kummerová i sur., 2006; Maslač i sur., 2016; Munzi i sur., 2012; Paoli i sur., 2015b).

Frekvencija vjetra iz smjera rafinerije se pokazala kao ključan prediktor u regresijskoj analizi. Pozitivno je korelirala s bioakumulacijom S i Ni, te s varijablama F1 (predstavlja sadržaj pigmenta) i F2 (predstavlja NPQ). To sugerira da povećana frekvencija vjetra intenzivira taloženje i doseg rasprostranjivanja onečišćujućih tvari, povećavajući razine određenih elemenata u tkivima lišajeva i posljedično smanjujući vitalnost lišajeva. S druge strane, postoji negativna korelacija između frekvencije vjetra i F4 (predstavlja F_v/F_m) i Pb. Ovi rezultati za F4 se poklapaju s očekivanjima, pokazujući niže vrijednosti F_v/F_m u uvjetima fiziološkog stresa (Gauslaa i sur., 2021; Kummerová i sur., 2006; Maslač i sur., 2016; Munzi i sur., 2012; Paoli i sur., 2015b), u ovom slučaju uzrokovane češćim vjetrovima s glavnog izvora onečišćenja.

Orijentacija lišajeva na stablu u odnosu na rafineriju pokazala je negativnu korelaciju s F3, kao i pozitivne korelacije sa Zn i Cd, dokazujući da su lišajevi orijentirani prema rafineriji potencijalno više izloženi određenim onečišćujućim tvarima. Gustoća vegetacije oko uzetih stabala imala je jedinstvenu negativnu korelaciju s razinama Pb, što ukazuje na to da gušća vegetacija može smanjiti akumulaciju Pb u lišajevima. To naglašava potencijalnu zaštitnu ulogu okolne vegetacije u smanjenju izloženosti onečišćujućim tvarima, barem za Pb.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je udaljenost od rafinerije bila negativno korelirana s većinom varijabli u oba modela, što je bilo očekivano (Garty i sur., 2000; Kummerová i sur., 2006; Munzi i sur., 2012; Paoli i sur., 2015b). Međutim udaljenost sama po sebi objašnjava

značajno manje varijabilnosti u svakoj zavisnoj varijabli u usporedbi s drugim modelom koji uključuje i ostale okolišne prediktore, među kojima su najznačajniji frekvencija i prosječna brzina vjetra iz smjera rafinerije. Postojeća istraživanja koja se bave lišajevima kao biomonitorima, pružaju samo kvalitativne uvide u podatke o vjetru (npr. (Stamenković i sur., 2013)). Ovo je prvo istraživanje koje koristi kvantitativne podatke o vjetru u regresijskom modelu usmjerenom na istraživanje lišajeva. Iako su Cristofolini i sur. (2008) istraživali ekološke prediktore povezane s onečišćenjem zraka i bioraznolikošću lišajeva u talijanskim Predalpama, nisu uključili podatke o vjetru. Uz to, fokusirali su se na bioraznolikost lišajeva te tako nisu proučavali učinak onečišćenja zraka na fiziološke promjene lišajeva (vitalnost lišajeva) i koncentracije elemenata (bioakumulacija). Također, prethodne ekofiziološke studije o lišajevima provedene na terenu obično su razmatrale samo udaljenost od glavnih izvora onečišćenja kao nezavisnu varijablu, ali ne i vjetar (npr. (González i Pignata, 2000; Paoli i sur., 2015a; Yemets i sur., 2014)). To je iznenađujuće, s obzirom na to da studije koje se bave kvalitetom zraka pomoću podataka s mjernih postaja, odnosno ne koriste biološke modele poput lišajeva, redovno pokazuju da su smjer i brzina vjetra važni prediktori onečišćenja zraka (vidi npr. Kim i sur. (2015)).

Iako dobiveni regresijski modeli objašnjavaju značajan dio ukupne varijabilnosti podataka mjerenja, ipak nezanemariv dio te varijabilnost ostaje neobjašnjenim modelima, što se jednim dijelom zasigurno može pripisati onečišćenju iz prometa i grijanja krutim gorivima. S obzirom da je na istraživanom području prisutna mješavina onečišćujućih tvari, možemo očekivati i pojave povezane s hormesisom (Tang i sur., 2022), koji još nije razmatran kod lišajeva.

5.4.2. *Transplantirani lišajevi*

Kod transplantiranih lišajeva, regresijski modeli za vrstu *F. caperata* (nakon izlaganja od tri mjeseca) pokazali su znatno manju prediktivnu snagu za većinu varijabli od regresijskih modela za native lišajeve iste vrste. Kod vrste *E. prunastri* najviše razine varijabilnosti objašnjene modelom zabilježene su za Ni i V, odnosno upravo one metale koji se smatraju pokazateljima onečišćenja zraka iz rafinerija (Celo i Dabek-Zlotorzynska, 2010). Brzina vjetra, kao i umnožak brzine vjetra i udaljenosti, pokazali su pozitivnu korelaciju, dok je frekvencija vjetra bila negativno korelirana s obje varijable (Ni i V). Slična razina varijabilnosti za V je objašnjena i u modelu kod vrste *F. caperata*, s istim korelacijama. Ovaj rezultat može se objasniti time da se pri većim brzinama vjetra ovi metali mogu distribuirati na veće udaljenosti i doprijeti do transplantiranih lišajeva, što su i potvrdili rezultati mjerenja tih metala u

lišajevima skupljenim na udaljenijim plohama. Na dvije najbliže plohe, gdje se može pretpostaviti da vjetar ima manji utjecaj zbog udaljenosti do samo dva kilometra, koncentracije N_i i V su ekstremno visoke (50 – 100 puta; detaljnije diskutirano u poglavlju „5.2. Transplantirani lišajevi“). S druge strane, (Cecconi i sur., 2019) i na ostalim plohama zabilježena je „vrlo visoka bioakumulacija“ (vrijednosti iznad 3,7 puta veće od kontrole); za N_i na svim plohama, a za V na polovici istraživanih ploha, što sve sugerira da se ti teški metali efikasno šire vjetrom u visokim koncentracijama na šire područje oko rafinerije nafte.

Za ostale je zavisne varijable kod *E. prunastri* razina objašnjene varijabilnosti sezala do najviše 20 %. Kod vrste *F. caperata* se za nemetale (N i S) može modelom objasniti oko jedne polovine varijabilnosti (47 % i 53 %), s time da su oba nemetala pozitivno korelirana s udaljenošću, dok je brzina vjetra negativno korelirana s N , a frekvencija vjetra sa S . S druge strane, pozitivno je korelirana interakcija udaljenosti i frekvencije vjetra s N te interakcija udaljenosti i brzine vjetra sa S . Kao što je detaljnije diskutirano u potpoglavlju „5.2. Transplantirani lišajevi“, S i N kod *F. caperata* u T1 imaju zanimljiv uzorak koncentracija, a s ovim modelom se pokazalo kako se ove kompleksne interakcije mogu objasniti kombinacijom parametara udaljenosti i brzine i frekvencije vjetra iz smjera rafinerije, barem u navedenom postotku varijabilnosti.

Generalno su modeli za transplantirane lišajeve pokazali znatno manju prediktivnu snagu, posebno za faktore koji objašnjavaju vitalnost lišajeva, iako i dalje imamo značajne korelacije. Jedno od potencijalnih objašnjenja može biti u tome da su nativni lišajevi, zbog duljine življenja u uvjetima prostora razvili jasnije uzorke i prilagodbe na onečišćenje zraka te druge okolišne čimbenike, dok kod transplantanata ti uzorci nisu toliko jasni te interpretabilni sa slično izgrađenim modelom. To je posebno izraženo kod F1, koji kod svih PCA uključuje parametre fotosintetskih pigmenata, čija je varijabilnost značajno manje objašnjena kod transplantanata (8 % za *F. caperata*, 5 % za *E. prunastri*), spram nativnih lišajeva (45 %).

Karte bioakumulacije elemenata odlučila sam prikazati kao vektorske točkaste podatke koji prikazuju srednje vrijednosti određenog elementa za tu plohu, gdje sam za metale koristila postojeću interpretativnu skalu (Cecconi i sur., 2019), a za nemetale sam jednostavno skalirala vrijednosti na način opisan u „3.3.3 Ocjena bioakumulacije metala i karte distribucije elemenata“. Teoretski gledano, mogla se proizvesti i rasterska karta distribucije bioakumulacije istraživanih elemenata primjenom odnosnog regresijskog modela. Međutim, takav je pristup ocijenjen kao nepouzdan, što je detaljnije raspravljeno u poglavlju „5.5. Metodološka ograničenja i preporuke za buduća istraživanja“.

5.5. Metodološka ograničenja i preporuke za buduća istraživanja

U usporedbi s laboratorijskim uvjetima, eksperimenti provedeni na terenu predstavljaju veći izazov zbog nemogućnosti kontroliranja svih uvjeta. Međutim, u nekim slučajevima oni mogu pružiti bolji uvid u utjecaj složenog i stvarnog okoliša, unatoč tome što to može otežati interpretaciju rezultata. Tako ovo istraživanje omogućuje uvid u stanje lišajeva na širem području Slavonskog Broda, što implicira i kvalitetu zraka te njegov utjecaj na ljude. Kao što je već spomenuto, lišajevi ne reagiraju specifično na određenu onečišćujuću tvar, već na ukupan učinak mješavine tvari (Conti i Cecchetti, 2001). Stoga se zaključci ovog istraživanja vjerojatno neće uvijek moći primjenjivati u drugim okruženjima s drugačijim mješavinama onečišćujućih tvari te klimom.

Kada se koriste organizmi iz okoliša te relativno skupe metode koje ponekad zahtijevaju veću količinu materijala, poput mjerenja teških metala, često se dobiva relativno mali broj replika, što je i ovdje slučaj. U drugim istraživanjima bioakumulacije teških metala također su korištene jedna do tri replike (Paoli et al., 2015a), međutim smatra se da je određivanje elemenata pomoću ICP-MS robusna metoda koja uključuje standardizaciju. Međutim, s obzirom na to da lišajevi, koji nisu jedinstveni organizmi nego zajednica nekoliko vrsta, mogu pokazivati prirodne varijacije, kako među različitim talusima, tako i unutar istog talusa, bilo bi poželjno provoditi istraživanja na većem broju uzoraka.

Iako je planirano da u istraživanju koristim kontrole i za native uzorke lišajeva te su one sakupljene na Požeškoj gori, početne analize pokazale su prisutnost određenog onečišćenja na toj lokaciji, što bi moglo dovesti do pogrešne interpretacije rezultata. Stoga sam odlučila ne koristiti kontrole za native uzorke, kako bi izbjegla pogrešnu interpretaciju dobivenih rezultata i zaključaka. Dodatno, u postojećim radovima o nativnim vrstama lišajeva, općenito se nije koristila kontrolna mjera (npr. za *F. caperata* oko odlagališta otpada (Paoli i sur., 2012)), što sugerira da takav pristup nije standardna praksa u ovakvom tipu istraživanja.

U ovom radu istražena je kombinacija različitih metoda i parametara, međutim za buduća istraživanja preporučila bih uključivanje dodatnih metoda, kao što je ispitivanje promjene integriteta membrana pomoću konduktometra. Ova metoda, koja mjeri promjenu provodljivosti nakon uranjanja tkiva u deioniziranu vodu, pokazala se kao dobar pokazatelj oštećenja talusa uslijed onečišćenja (Yemets i sur., 2015). Također, u međuvremenu je objavljeno istraživanje koje preporuča da prije mjerenja maksimalne učinkovitosti PSII (F_v/F_m) treba omogućiti lišajevima da se oporave pri niskom intenzitetu svjetlosti, a ne u tami, kako bi

se optimizirao oporavak od fotoinhibicije (Solhaug, 2018). S obzirom da sam prije mjerenja ostavila lišajeve da se adaptiraju u tami, moguće je da su se oni potencijalno, barem djelomično, „oporavili“ te je upravo to bio jedan od razloga zašto se ovaj parametar nije pokazao znatnije osjetljiv na onečišćenje zraka.

Meteorološki uvjeti na području Slavanskog Broda, zahvaljujući blizini rijeke Save i gorja u zaleđu Slavanskog Broda, pridonose stvaranju tzv. nepovoljnih situacija koje se odlikuju zatvorenim cirkulacijama onečišćujućih tvari, koje su posebno izražene tijekom stagnacijskih zimskih uvjeta (Ekonerg, 2016). Stoga bi buduća istraživanja trebala dodatno proučiti druge okolišne uvjete koji, uz vjetar istražen u ovom radu, mogu utjecati na širenje onečišćujućih tvari i bioakumulaciju u lišajevima. Preporuča se interdisciplinarni pristup, što podrazumijeva zajednički rad biologa i geofizičara te kombiniranje različitih pristupa za rješavanje iste problematike, gdje je područje Slavanskog Broda, s obzirom na sada prikupljene podatke, idealno područje u Hrvatskoj za nastavak takvog istraživanja.

Kao komplementarno istraživanje, bilo bi zanimljivo na istim plohama provesti istraživanje biološke raznolikosti lišajeva, za što postoji standardizirana metodologija za sakupljanje podataka te interpretaciju kvalitete zraka (BS EN 16413, 2014).

U međuvremenu, od provedbe terenskog dijela ovog istraživanja, došlo je do određenih promjena u radu rafinerije nafte. Naime, 9. listopada 2018. godine dogodila se nesreća u rafineriji, tijekom koje je došlo do eksplozije dijela kompleksa. Od tada, rafinerija ne prerađuje sirovu naftu, već se preusmjerila na proizvodnju stlačenog prirodnog plina i polimernog bitumena. Bilo bi zanimljivo istražiti jesu li lišajevi rekolonizirali područje zabilježene „lišajne pustinje“. Unatoč prestanku prerade sirove nafte, mjerenja pokazuju kako Slavonski Brod i dalje redovito ima lošu kvalitetu zraka (MZOZT, 2024) te bi bilo zanimljivo istražiti razloge i izvore. S obzirom da primjerice „povijesno olovo“, koje potječe iz benzina, ostaje važan izvor olova zbog svoje otpornosti i učinkovite remobilizacije (Resongles i sur., 2021), može se očekivati da će depozicija različitih teških metala na području ovog istraživanja još potrajati barem neko vrijeme .

6. ZAKLJUČAK

Istražujući područje Slavonskog Broda, koje je poznato kao mjesto najvećeg onečišćenja zraka u Hrvatskoj, korištenjem dva metodološka pristupa (nativni i transplantirani lišajevi) i različitih mjerenih parametara na raznim vrstama lišajeva (bioakumulacija, vitalnost, sekundarni metaboliti), omogućeno je dublje razumijevanje učinaka onečišćenja zraka na lišajeve u tom području. Ova je studija, kao prva primjena biomonitoringa na ovom području, dodatno potvrdila da je obližnja rafinerija neupitan i značajan izvor onečišćenja zraka u njezinom širem okruženju, kao i s time povezanih velikih okolišnih problema povezanih s kvalitetom zraka.

Rezultati su pokazali da područje najbliže rafineriji (do 2 km) trpi ekstremno onečišćenje zraka, posebno zbog rekordno visokih koncentracija nikla (Ni) i vanadija (V) izmjerenih u transplantiranim lišajevima na tim plohama. Onečišćenje je toliko intenzivno da je na tim lokalitetima prisutna „lišajna pustinja“, gdje nativni lišajevi ne postoje, što je danas rijetka pojava u Europi.

Dodatno, lišajevi su pokazali da se onečišćenje zraka ne širi koncentrično oko rafinerije, jer je regresijska analiza potvrdila značajan utjecaj i drugih (uz udaljenost do rafinerije) okolišnih čimbenika (frekvencija i brzina vjetra, orijentacija lišaja na stablu, gustoća vegetacije) na vitalnost, bioakumulaciju i sekundarne metabolite. Među analiziranim faktorima, najveći utjecaj imale su frekvencija i srednja brzina vjetra iz smjera rafinerije, što je prvi put kvantificirano u sklopu biomonitoringa kvalitete zraka pomoću lišajeva. U gradu Slavonski Brod, koji se nalazi u dominantnom dijelu vjetra iz pravca rafinerije, situaciju dodatno otežavaju i kućna ložišta, promet i manja lokalna industrija. Ovaj efekt se odrazio na rezultate dobivene s lišajevima sakupljenim na području grada, u kojima je izmjerena vrlo visoka koncentracija metala, poput Ni i V, za koje se zna da potječu iz rafinerije, ali i N, kojem su u velikoj mjeri izvori promet i kućna ložišta iz samog grada.

Parametri vitalnosti lišajeva, uključujući i one dobivene često korištenom metodom procjene učinkovitosti fotosintetskog aparata, pokazali su se kao manje osjetljivi indikatori kvalitete zraka u odnosu na parametre bioakumulacije. Ipak, zabilježeni su poznati efekti „fertilizacije“ — s povećanjem koncentracije dušika unutar grada dolazi do porasta koncentracije fotosintetskih pigmenata. Sekundarni metaboliti nisu pokazali značajnu povezanost s onečišćenjem zraka ili bioakumulacijom onečišćujućih tvari. Rezultati usporedbe

bioakumulacije metala u nativnim i transplantiranim lišajevima u skladu su s očekivanjima: bioakumulacija Ni, Zn, Cd i Pb bila je generalno viša u nativnim uzorcima. Međutim, transplantirani lišajevi su imali više koncentracije nemetala N i S.

Ovim smo istraživanjem također otkrili i dodatne izvore onečišćenja, kao što je farma purana u zapadnom dijelu istraživačkog područja, što vjerojatno doprinosi višim vrijednostima N u njezinoj okolini. Osim toga, industrija u Lužanima i Oriovcu predstavlja potencijalan izvor teških metala, što je vjerojatno dovelo do vrlo visoke bioakumulacije šest teških metala u tom području. Također, čini se da bi industrija unutar samog Slavenskog Broda mogla biti odgovorna za povećane koncentracije Mn u podnožju Dilj gore.

Iako postoje očekivana ograničenja u korištenju bioloških organizama za praćenje kvalitete zraka, kao što je prirodna varijacija u heterogenom okruženju, lišajevi su već odavno globalno prepoznati kao pouzdani pokazatelji onečišćenja zraka. Neke zemlje, poput Italije i Sjedinjenih Američkih Država, uspješno su integrirale lišajeve u svoje sustave praćenja kvalitete zraka, dok to još uvijek nedostaje u mnogim regijama, uključujući i Hrvatsku. Stoga se nadam da će ovo istraživanje potaknuti usvajanje biomonitoringa pomoću lišajeva u strategije i politike praćenja kvalitete zraka i u našoj zemlji.

7. POPIS LITERATURE

- Abas, A., 2021. A systematic review on biomonitoring using lichen as the biological indicator: A decade of practices, progress and challenges. *Ecol. Indic.* 121, 107197. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107197>
- Alebić-Juretić, A., Arko-Pijevac, M., 1989. Air pollution damage to cell membranes in lichens -Results of simple biological test applied in Rijeka, Yugoslavia. *Water. Air. Soil Pollut.* 47, 25–33.
- Aprile, G.G., Di Salvatore, M., Carratù, G., Mingo, A., Carafa, A.M., 2010. Comparison of the suitability of two lichen species and one higher plant for monitoring airborne heavy metals. *Environ. Monit. Assess.* 162, 291–299. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0796-x>
- Augusto, S., Maguas, C., Matos, J., Pereira, M.J., Branquinho, C., 2010. Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: A comparison with soil, air and pine needles. *Environ. Pollut.* 158, 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.016>
- Bajpai, R., Upreti, D.K., Nayaka, S., Kumari, B., 2010. Biodiversity, bioaccumulation and physiological changes in lichens growing in the vicinity of coal-based thermal power plant of Raebareli district, north India. *J. Hazard. Mater.* 174, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.071>
- Baptista, M.S., Vasconcelos, M.T.S.D., Cabral, J.P., Freitas, M.C., Pacheco, A.M.G., 2008. Copper, nickel and lead in lichen and tree bark transplants over different periods of time. *Environ. Pollut.* 151, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.004>
- Białońska, D., Dayan, F.E., 2005. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *J. Chem. Ecol.* 31, 2975–2991. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-8408-x>
- Boltersdorf, S., Werner, W., 2013. Source attribution of agriculture-related deposition by using total nitrogen and $\delta^{15}\text{N}$ in epiphytic lichen tissue, bark and deposition water samples in Germany. *Isotopes Environ. Health Stud.* 49, 197–218. <https://doi.org/10.1080/10256016.2013.748051>

- Brunialti, G., Frati, L., 2014. Bioaccumulation with lichens: the Italian experience. *Int. J. Environ. Stud.* 71, 15–26. <https://doi.org/10.1080/00207233.2014.880996>
- Brunialti, G., Frati, L., 2007. Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: A retrospective study over a 7-year time span. *Sci. Total Environ.* 387, 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.06.033>
- BS EN 16413, 2014. Ambient air — Biomonitoring with lichens — Assessing epiphytic lichen diversity. London.
- Cecconi, E., Fortuna, L., Benesperi, R., Bianchi, E., Brunialti, G., Contardo, T., Nuzzo, L. Di, Frati, L., Monaci, F., Munzi, S., Nascimbene, J., Paoli, L., Ravera, S., Vannini, A., Giordani, P., Loppi, S., Tretiach, M., 2019. New interpretative scales for lichen bioaccumulation data: The italian proposal. *Atmosphere (Basel)*. 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/atmos10030136>
- Cecconi, E., Fortuna, L., Peplis, M., Tretiach, M., 2021. Element accumulation performance of living and dead lichens in a large-scale transplant application. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 16214–16226. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11797-7>
- Celo, V., Dabek-Zlotorzynska, E., 2010. Concentration and Source Origin of Trace Metals in PM_{2.5} Collected at Selected Canadian Sites within the Canadian National Air Pollution Surveillance Program, in: Zereini, F., Wiseman, C.L.S. (Eds.), *Urban Airborne Particulate Matter*, Environmental Science and Engineering. pp. 19–38. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12278-1_2
- Chahloul, N., Mendili, M., Ourane, M., Kthiri, Z., Raïes, A., Loppi, S., Khadhri, A., 2024. Potential of *Flavoparmelia caperata* transplants in highly polluted environments to monitoring air quality in some urban areas: first lichen transplantation in Tunisia. *Euro-Mediterranean J. Environ. Integr.* <https://doi.org/10.1007/s41207-024-00564-6>
- Conti, M., Cecchetti, G., 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment — a review. *Environ. Pollut.* 114, 471–492. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00224-4)
- Conti, M.E., Pino, A., Botrè, F., Bocca, B., Alimonti, A., 2009. Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1082–1089.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.004>

- Cristofolini, F., Giordani, P., Gottardini, E., Modenesi, P., 2008. The response of epiphytic lichens to air pollution and subsets of ecological predictors: A case study from the Italian Prealps. *Environ. Pollut.* 151, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.040>
- Deltoro, V.I., Gimeno, C., Calatayud, A., Barreno, E., 1999. Effects of SO₂ fumigations on photosynthetic CO₂ gas exchange, chlorophyll a fluorescence emission and antioxidant enzymes in the lichens *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*. *Physiol. Plant.* 105, 648–654. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105408.x>
- DLS, 2018. Akcijski plan za poboljšanje kvalitete zraka - grad Slavonski Brod. Slavonski Brod.
- Državna geodetska uprava, 2015. Državna geodetska uprava - Geoportal [WWW Document]. (accessed 8.11.24)
- Dvokut Ecro, 2022. Akcijski plan poboljšanja kvalitete zraka za grad Slavonski Brod.
- Dymytrova, L., Stofer, S., Ginzler, C., Breiner, F.T., Scheidegger, C., 2016. Forest-structure data improve distribution models of threatened habitat specialists: Implications for conservation of epiphytic lichens in forest landscapes. *Biol. Conserv.* 196, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.01.030>
- Ekonerg, 2016. Akcijski plan poboljšanja kvalitete zraka za grad Slavonski Brod. Zagreb.
- Elix, J.A., Stocker-Wörgötter, E., 2008. Biochemistry and secondary metabolites, in: Nash III, T.H. (Ed.), *Lichen Biology*. Cambridge University Press, pp. 104–133.
- European Environment Agency, 2024a. Air quality in Europe 2024 - Report.
- European Environment Agency, 2024b. Air Quality [WWW Document]. URL https://environment.ec.europa.eu/topics/air/air-quality_en (accessed 8.11.24).
- Feige, G.B., Lumbsch, H.T., Huneck, S., Elix, J.A., 1993. Short Communication Identification of lichen substances by a standardized liquid chromatographic method. *J. Chromatogr.* 646, 417–427.
- Forbes, P.B.C., van der Wat, L., Kroukamp, E.M., 2015. Biomonitors, in: Forbes, P.B.C. (Ed.), *Monitoring of Air Pollutants*. Elsevier, pp. 53–108. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2015.09.003>

- Fracheboud, Y., Leipner, J., 2003. The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress, in: Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. Springer US, Boston, Ma, pp. 125–150.
- Frati, L., Brunialti, G., Loppi, S., 2005. Problems related to lichen transplants to monitor trace element deposition in repeated surveys: A case study from central Italy. J. Atmos. Chem. 52, 221–230. <https://doi.org/10.1007/s10874-005-3483-5>
- Frati, L., Santoni, S., Nicolardi, V., Gaggi, C., Brunialti, G., Guttova, A., Gaudino, S., Pati, A., Pirintsos, S.A., Loppi, S., 2007. Lichen biomonitoring of ammonia emission and nitrogen deposition around a pig stockfarm. Environ. Pollut. 146, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.03.029>
- Garty, J., Karary, Y., Harel, J., 1993. The impact of air pollution on the integrity of cell membranes and chlorophyll in the lichen *Ramalina duriaei* (de not.) bagl. transplanted to industrial sites in Israel. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24, 455–460. <https://doi.org/10.1007/BF01146161>
- Garty, J., Weissman, L., Tamir, O., Beer, S., Cohen, Y., Karnieli, A., Orlovsky, L., 2000. Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. Physiol. Plant. 109, 410–418. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100407.x>
- Gauslaa, Y., Maslać Mikulec, M., Solhaug, K.A., 2021. Short-term growth experiments – A tool for quantifying lichen fitness across different mineral settings. Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants 282. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151900>
- Gauslaa, Y., Yemets, O.A., Asplund, J., Solhaug, K.A., 2016. Carbon based secondary compounds do not provide protection against heavy metal road pollutants in epiphytic macrolichens. Sci. Total Environ. 541, 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.114>
- González, C.M., Casanovas, S.S., Pignata, M.L., 1996. Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Córdoba, Argentina. Environ. Pollut. 91, 269–77. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00076-3)
- González, C.M., Pignata, M.L., 2000. Chemical response of transplanted lichen *Canomaculina pilosa* to different emission sources of air pollutants. Environ. Pollut. 110, 235–42.

[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00300-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00300-0)

- Hauck, M., 2010. Ammonium and nitrate tolerance in lichens. *Environ. Pollut.* 158, 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.036>
- Hawksworth, D.L., 1970. Lichens as litmus for air pollution: a historical review. *Int. J. Environ. Stud.* 1, 281–296. <https://doi.org/10.1080/00207237108709429>
- Hawksworth, D.L., Rose, F., 1970. Qualitative Scale for estimating Sulphur Dioxide Air Pollution in England and Wales using Epiphytic Lichens. *Nature* 227, 145–148.
- Holt, E.A., Miller, S.W., 2011. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 8–13.
- Howe, P., Malcolm, H., Dobson, S., 2004. Manganese and its compounds: environmental aspects. United Nations Environ. Program. Int. Labour Organ. World Heal. Organ. Inter-Organization Program. Sound Manag. Chem. Int. Progr. Chem. Safety. 63.
- Hrvatske šume, 2015. HŠ fond [WWW Document] (accessed 8.11.24).
- Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin.
- Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, 2016. Izvještaj o praćenju kvalitete zraka na postajama državne mreže za 2015. godinu. Zagreb.
- Jeričević, A., Gašparac, G., Maslač Mikulec, M., Kumar, P., Telišman Prtenjak, M., 2019. Identification of diverse air pollution sources in a complex urban area of Croatia. *J. Environ. Manage.* 243, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.024>
- Karakoti, N., Bajpai, R., Upreti, D.K., Mishra, G.K., Srivastava, A., Nayaka, S., 2014. Effect of metal content on chlorophyll fluorescence and chlorophyll degradation in lichen *Pyxine coccinea* (Sw.) Nyl.: A case study from Uttar Pradesh, India. *Environ. Earth Sci.* 71, 2177–2183. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2623-5>
- Kim, K.H., Lee, S.B., Woo, D., Bae, G.N., 2015. Influence of wind direction and speed on the transport of particle-bound PAHs in a roadway environment. *Atmos. Pollut. Res.* 6, 1024–1034. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2015.05.007>
- Kularatne, K.I., A., de Freitas, C.R., 2013. Epiphytic lichens as biomonitors of airborne heavy metal pollution. *Environ. Exp. Bot.* 88, 24–32.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.010>

- Kumari, K., Kumar, V., Nayaka, S., Saxena, G., Sanyal, I., 2024. Physiological alterations and heavy metal accumulation in the transplanted lichen *Pyxine cocos* (Sw.) Nyl. in Lucknow city, Uttar Pradesh. *Environ. Monit. Assess.* 196. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-12256-9>
- Kummerová, M., Barták, M., Dubová, J., Triska, J., Zubrová, E., Zezulka, S., 2006. Inhibitory effect of fluoranthene on photosynthetic processes in lichens detected by chlorophyll fluorescence. *Ecotoxicology* 15, 121–31. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0037-1>
- Lackovičová, A., Guttová, A., Bačkor, M., Pišút, P., Pišút, I., 2013. Response of *Evernia prunastri* to urban environmental conditions in Central Europe after the decrease of air pollution. *Lichenologist* 45, 89–100. <https://doi.org/10.1017/S002428291200062X>
- Li, X., Jin, L., Kan, H., 2019. Air pollution: a global problem needs local fixes. *Nature* 570, 437–439. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01960-7>
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Knapp, M., 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43, 379–393. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0062-6>
- Lippo, H., Poikolainen, J., Kubin, E., 1995. The use of moss, lichen and pine bark in the nationwide monitoring of atmospheric heavy metal deposition in Finland. *Water. Air. Soil Pollut.* 85, 2241–2246.
- Loppi, S., Frati, L., Paoli, L., Bigagli, V., Rossetti, C., Bruscoli, C., Corsini, A., 2004. Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Sci. Total Environ.* 326, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.12.003>
- Majumder, S., Mishra, D., Ram, S.S., Jana, N.K., Santra, S., Sudarshan, M., Chakraborty, A., 2013. Physiological and chemical response of the lichen, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, to the urban environment of Kolkata, India. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3077–3085. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1224-2>

- Mallows, C.L., 1973. Some comments on Cp. *Technometrics* 15, 661–675.
<https://doi.org/10.2307/1267380>
- Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., Bezirtzoglou, E., 2020. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front. Public Heal.* 8, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014>
- Marques, A.P., Freitas, M.C., Wolterbeek, H.T., Verburg, T., 2009. *Parmelia sulcata* lichen transplants positioning towards wind direction (Part I): Precipitation volumes, total element deposition and lichen element content. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 281, 225–230.
<https://doi.org/10.1007/s10967-009-0111-x>
- Maslač, A., Maslač, M., Tkalec, M., 2016. The impact of cadmium on photosynthetic performance and secondary metabolites in the lichens *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata* and *Evernia prunastri*. *Acta Bot. Croat.* 75, 186–193.
<https://doi.org/10.1515/botcro-2016-0034>
- Maslač, M., Partl, A., 2016. Adapting an American method for determining air quality in the European floodplain forest (Motovun Forest, Croatia), in: *The 8th IAL Symposium Lichens in Deep Time*.
- Maslač Mikulec, M., Likić, S., Antonić, O., Tkalec, M., 2025. Any Way the Wind Blows Does Really Matter in Lichen Response to Air Pollution from an Oil Refinery. *Toxics* 13, 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxics13030160>
- Mateos, A.C., González, C.M., 2016. Physiological response and sulfur accumulation in the biomonitor *Ramalina celastri* in relation to the concentrations of SO₂ and NO₂ in urban environments. *Microchem. J.* 125, 116–123.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.11.025>
- Maxwell, K., Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 659–668.
- Mehmedović, A., Maslač Mikulec, M., Prlić, D., Essert, S., Ozimec, S., 2019. New Achievements in Croatian Lichen Flora Inventorisation, in: Jasprica, N., Car, A. (Eds.), *Zagreb*.
- Molnár, K., Farkas, E., 2010. Current results on biological activities of lichen secondary

- metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforsch.* 65, 157–73.
- Munzi, S., Graça, C., Martins, D., Máguas, C., 2023. Differential response of two acidophytic lichens to increased reactive nitrogen availability. *Biologia (Bratisl.)* 78, 2049–2057. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01366-x>
- Munzi, S., Paoli, L., Fiorini, E., Loppi, S., 2012. Physiological response of the epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. to ecologically relevant nitrogen concentrations. *Environ. Pollut.* 171, 25–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.001>
- Munzi, S., Pisani, T., Paoli, L., Renzi, M., Loppi, S., 2013. Effect of nitrogen supply on the C/N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Turkish J. Biol.* 37, 165–170. <https://doi.org/10.3906/biy-1205-4>
- Munzi, S., Ravera, S., Caneva, G., 2007. Epiphytic lichens as indicators of environmental quality in Rome. *Environ. Pollut.* 146, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.03.042>
- MZOZT, 2025. Registar onečišćavanja okoliša [WWW Document]. Minist. zaštite okoliša i Zel. tranzicije. URL <https://roo.azo.hr/> (accessed 2.2.25)
- MZOZT, 2024. Kvaliteta zraka u Republici Hrvatskoj [WWW Document]. URL <https://iszz.azo.hr/iskzl/index.html> (accessed 8.10.24).
- Nash III, T.H., 2008. *Lichen Biology*, Second ed. ed, Taxon. Cambridge University Press, New York.
- Ochoa-Hueso, R., Manrique, E., 2011. Effects of nitrogen deposition and soil fertility on cover and physiology of *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd., a lichen of biological soil crusts from Mediterranean Spain. *Environ. Pollut.* 159, 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.021>
- Orange, A., James, P.W., White, F.W., 2001. *Microchemical methods for the identification of lichens*, British Lichen Society. British Lichen Society.
- Ozimec, S., Florijancic, T., Boskovic, I., 2016. Biomonitoring Urban Air Pollution By Using Lichens in the Green Space of the University Campus in Osijek (Croatia). *J. Environ. Prot. Ecol.* 17, 1269–1275.

- Oztetik, E., Cicek, A., 2011. Effects of urban air pollutants on elemental accumulation and identification of oxidative stress biomarkers in the transplanted lichen *Pseudovernia furfuracea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1629–1636. <https://doi.org/10.1002/etc.541>
- Paoli, L., Corsini, A., Bigagli, V., Vannini, J., Bruscoli, C., Loppi, S., 2012. Long-term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. *Environ. Pollut.* 161, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.028>
- Paoli, L., Grassi, A., Vannini, A., Maslaňáková, I., Bil'ová, I., Bačkor, M., Corsini, A., Loppi, S., 2015a. Epiphytic lichens as indicators of environmental quality around a municipal solid waste landfill (C Italy). *Waste Manag.* 42, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.04.033>
- Paoli, L., Guttová, A., Grassi, A., Lackovi, A., Sorbo, S., Basile, A., Loppi, S., 2015b. Ecophysiological and ultrastructural effects of dust pollution in lichens exposed around a cement plant (SW Slovakia). *Env. Sci Pollut Res* 20, 15891–15902. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4807-x>
- Paoli, L., Guttová, A., Sorbo, S., Lackovičová, A., Ravera, S., Landi, S., Landi, M., Basile, A., Sanità di Toppi, L., Vannini, A., Loppi, S., Fačkovcová, Z., 2020. Does air pollution influence the success of species translocation? Trace elements, ultrastructure and photosynthetic performances in transplants of a threatened forest macrolichen. *Ecol. Indic.* 117. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106666>
- Paoli, L., Maslaňáková, I., Grassi, A., Bačkor, M., Loppi, S., 2015c. Effects of acute NH₃ air pollution on N-sensitive and N-tolerant lichen species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.025>
- Paoli, L., Munzi, S., Guttová, A., Senko, D., Sardella, G., Loppi, S., 2015d. Lichens as suitable indicators of the biological effects of atmospheric pollutants around a municipal solid waste incinerator (S Italy). *Ecol. Indic.* 52, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.12.018>
- Paoli, L., Vannini, A., Fačkovcová, Z., Guarnieri, M., Bačkor, M., Loppi, S., 2018a. One year of transplant: Is it enough for lichens to reflect the new atmospheric conditions? *Ecol. Indic.* 88, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.01.043>
- Paoli, L., Vannini, A., Monaci, F., Loppi, S., 2018b. Competition between heavy metal ions

- for binding sites in lichens: Implications for biomonitoring studies. *Chemosphere* 199, 655–660. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.066>
- Pawlik-Skowrońska, B., Bačkor, M., 2011. Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatins than specimens living in unpolluted habitats. *Environ. Exp. Bot.* 72, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.07.002>
- Preisendorfer, R.W., Zwiers, F.W., Barnett, T.P., 1981. Foundations of principal component selection rules. *SIO Ref. Ser.* 81-4 May 1981 192.
- Rafinerija nafte Brod, 2024. Rafinerija nafte Brod [WWW Document]. URL <https://rafinerija.com/Content/Read/prerada-i-proizvodnja> (accessed 8.11.24)
- Ragothaman, A., Anderson, W.A., 2017. Air Quality Impacts of Petroleum Refining and Petrochemical Industries. *Environments* 4, 66. <https://doi.org/10.3390/environments4030066>
- Resongles, E., Dietze, V., Green, D.C., Harrison, R.M., Ochoa-Gonzalez, R., Tremper, A.H., Weiss, D.J., 2021. Strong evidence for the continued contribution of lead deposited during the 20th century to the atmospheric environment in London of today. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102791118>
- Rola, K., 2020. Insight into the pattern of heavy-metal accumulation in lichen thalli. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 61, 126512. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126512>
- Rola, K., Latkowska, E., Myśliwa-Kurdziel, B., Osyczka, P., 2019. Heavy-metal tolerance of photobiont in pioneer lichens inhabiting heavily polluted sites. *Sci. Total Environ.* 679, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.002>
- Seaward, M.R.D., 1997. Urban deserts bloom: a lichen renaissance. *Bibl. Lichenol.* 67, 297–309.
- Shukla, V., Upreti, D.K., Bajpai, R., 2014. Lichens to biomonitor the environment. Springer India, New Delhi. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1503-5>
- Smodiš, B., Parr, R.M., 1999. Biomonitoring of air pollution as exemplified by recent IAEA programs. *Biol. Trace Elem. Res.* 71–72, 257–266. <https://doi.org/10.1007/BF02784211>
- Solhaug, K.A., 2018. Low-light recovery effects on assessment of photoinhibition with

- chlorophyll fluorescence in lichens. *Lichenol.* 50, 139–145.
<https://doi.org/10.1017/S0024282917000640>
- Stamenković, S.S., Mitrović, T.L.J., Cvetković, V.J., Krstić, N.S., Baošić, R.M., Marković, M.S., Nikolić, N.D., Marković, V.L.J., Cvijan, M. V., 2013. Biological indication of heavy metal pollution in the areas of donje vlase and cerje (southeastern Serbia) using epiphytic lichens. *Arch. Biol. Sci.* 65, 151–159. <https://doi.org/10.2298/ABS1301151S>
- Tang, L., Yang, M., Zhang, Y., Sun, H., 2022. Hormesis-based cross-phenomenon in judging joint toxic action for mixed pollutants. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 28.
- Valencia-Islas, N., Zambrano, A., Rojas, J.L., 2007. Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City. *J. Chem. Ecol.* 33, 1619–1634.
<https://doi.org/10.1007/s10886-007-9330-1>
- von Arb, C., Mueller, C., Ammann, K., Brunold, C., 1990. Lichen physiology and air pollution. *New Phytol.* 115, 431–437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00468.x>
- Wadleigh, M.A., 2003. Lichens and atmospheric sulphur: what stable isotopes reveal. *Environ. Pollut.* 126, 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00247-1)
- WHO, 2021. WHO global air quality guidelines.
- Yemets, O., Gauslaa, Y., Solhaug, K.A., 2015. Monitoring with lichens – Conductivity methods assess salt and heavy metal damage more efficiently than chlorophyll fluorescence. *Ecol. Indic.* 55, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.03.015>
- Yemets, O.A., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2014. Spatial dispersal of airborne pollutants and their effects on growth and viability of lichen transplants along a rural highway in Norway. *Lichenol.* 46, 809–823. <https://doi.org/10.1017/S0024282914000449>
- Zaninović, K., Gajić-Čapka, M., Perčec Tadić, M., Vučetić, M., Milković, J., Bajić, A., Cindrić, K., Cvitan, L., Katušin, Z., Kaučić, D., Likso, T., Lončar, E., Lončar, Ž., Mihajlović, D., Pandžić, K., Patarčić, M., Srnec, L., Vučetić, V., 2008. Klimatski atlas Hrvatske / Climate atlas of Croatia 1961-1990., 1971-2000.
- Zhang, R., Wilson, V.L., Hou, A., Meng, G., 2015. Source of lead pollution, its influence on public health and the countermeasures. *Int. J. Heal. Anim. Sci. Food Saf.* 2, 18–31.

Zakoni, uredbе i standardi:

Zakon o zaštiti zraka (NN 127/19, 57/22 i 136/24)

Uredba o razinama onečišćujućih tvari u zraku (NN 77/20)

HRN EN 13657:2008 - Karakterizacija otpada – Digestija zlatotopkom za naknadno određivanje topivih elemenata (EN 13657:2002)

HRN EN ISO 17294-1,2:2008. *Kakvoća vode - Primjena masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) za određivanje elemenata - 1. dio: Opće smjernice i osnovna načela* (ISO 17294-1:2004; EN ISO 17294-1:2006) i *Kakvoća vode - Primjena masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) za određivanje elemenata - 2. dio: Određivanje 62 elementa* (ISO 17294-2:2003; EN ISO 17294-2:2004)

8. PRILOZI

Prilog 1 Koordinate centroida istraživačkih ploha (EPSG:3765 - HTRS96 / Croatia TM).

Ploha	x	y
1	615966,50	4999675,47
2	615850,07	4999761,89
3	615793,72	5000687,22
4	615640,02	4998835,24
5	614863,49	4998224,71
6	614051,71	4999497,37
7	617610,23	5003179,03
8	619615,00	5002181,73
9	618808,64	5003007,25
10	613352,52	5003996,49
11	610524,01	4994565,52
12	611751,57	5006490,72
13	607495,98	5001532,03
14	622928,37	5007715,60
15	621147,64	5008932,91
16	628056,24	5000905,86
17	605523,26	5002333,81
18	606510,54	4992253,85
19	600281,16	4997059,50
20	633887,13	4996922,39



REPUBLIKA HRVATSKA
MINISTARSTVO ZAŠTITE OKOLIŠA
I PRIRODE

HR-10000 Zagreb, Radnička cesta 80
Tel: 01/3717 111, fax: 01/4866 100

KLASA: UP/I-612-07/15-48/103
URBROJ: 517-07-1-1-15-5
Zagreb, 16. lipnja 2015.

Ministarstvo zaštite okoliša i prirode na temelju članka 155. Zakona o zaštiti prirode (Narodne novine, broj 80/2013), povodom zahtjeva tvrtke imena OIKON d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju, Trg senjskih uskoka 1-2, HR-10000 Zagreb, za izuzeće od zabranjenih radnji sa strogo zaštićenim vrstama donosi sljedeće

RJEŠENJE

1. **Dopušta se** tvrtki imena OIKON d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju, Trg senjskih uskoka 1-2, HR-10000 Zagreb izuzimanje iz prirode dijelova jedinki strogo zaštićenih vrsta epifitskih lišaja (Lichenes) na područja okolice Slavonskog Broda.
2. Odgovorna osoba za dopuštene radnje iz točke 1. rješenja je Maja Maslač.
3. Dopuštenje se daje uz sljedeće uvjete:
 - dopušteno je sakupiti najviše jedan (1) do dva (2) uzorka po vrsti, pazeći pri tom da se ne izuzima više od trećine jedinki po lokalitetu.
4. Nositelj rješenja dužan je ovom Ministarstvu podnijeti izvješće u pisanom i digitalnom obliku na obrascu Ministarstva, **najkasnije do 31. ožujka 2017. godine.**
5. Dopuštenje vrijedi do **01. ožujka 2017. godine.**
6. U slučaju nepridržavanja propisanih uvjeta, Ministarstvo može ukinuto izdano rješenje.

O b r a z l o ž e n j e

Tvrtka imena OIKON d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju, Trg senjskih uskoka 1-2, HR-10000 Zagreb uputila je ovom Ministarstvu zahtjev za izuzeće od zabranjenih radnji sa strogo zaštićenim vrstama, a koje se odnosi na izuzimanje iz prirode dijelova jedinki strogo zaštićenih vrsta epifitskih lišaja (Lichenes) na područja okolice Slavonskog Broda u svrhu izrade doktorske disertacije Maje Maslač, pod nazivom „Lišajevi kao bioindikatori zagađenja u okolišu“.

Među istraživanim vrstama lišajeva nalaze se i one koje su strogo zaštićene prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine, broj 144/2013).

U postupku donošenja ovog rješenja utvrđeno je da se radi o zahtjevu za izuzeće od zabranjenih radnji sa strogo zaštićenim vrstama u interesu zaštite divljih vrsta biljaka te u svrhu istraživanja i edukacije temeljem članka 155. stavka 2., podstavaka 1. i 4. Zakona o zaštiti prirode. Prema članku 156. stavku 2. istog Zakona predmetni zahtjev je prosljeđen Državnom zavodu za zaštitu prirode na stručno mišljenje te je isto (KLASA: 612-07/15-13/88) dostavljeno Ministarstvu. U stručnom mišljenju se navodi da navedeno izuzimanje iz prirode dijelova jedinki strogo zaštićenih vrsta lišajeva neće negativno utjecati na populacije strogo zaštićenih vrsta na području sakupljanja, odnosno izuzimanja iz prirode.

Prema članku 153. stavku 1. Zakona o zaštiti prirode zabranjeno je branje, rezanje, sječa, iskopavanje, sakupljanje ili uništavanje jedinki strogo zaštićenih biljaka, gljiva, lišajeva i algi iz prirode u njihovu prirodnom području rasprostranjenosti.

Prema članku 155. stavku 2. podstavku 4. Zakona o zaštiti prirode pod uvjetom da ne postoje druge pogodnosti te da odstupanje neće štetiti održavanju populacija strogo zaštićenih vrsta u povoljnom stanju očuvanja u njihovu prirodnom području rasprostranjenosti, Ministarstvo može dopustiti odstupanje od odredbi članka 153. istoga Zakona u interesu zaštite divljih vrsta biljaka te u svrhu istraživanja i edukacije. Slijedom navedenog riješeno je kao u točki 1. izrijeka.

Prema članku 157. stavku 3. Zakona dopuštenje sadrži uvjete za obavljanje aktivnosti, rok obavljanja aktivnosti te obvezu praćenja i izvješćivanja o provedenoj aktivnosti. Slijedom navedenog riješeno je kao u točkama 2.-5. izrijeka.

Prema članku 130. Zakona o općem upravnom postupku (Narodne novine, broj 47/2009) zakonito rješenje kojim je stranka stekla kakvo pravo može se ukinuti u cijelosti ili djelomično ako sadržava pridržaj ukidanja, a stranka nije ispunila obvezu iz rješenja ili je nije ispunila u roku te je stoga riješeno kao u točki 6. izrijeka.

Nakon upućenog zaključka gornjih oznaka o potrebi dostave upravne pristojbe u iznosu od 70,00 kn u državnim biljezima, prema Tarifnom broju 1. i 2. Zakona o upravnim pristojbama (Narodne novine, br. 08/96, 77/96, 131/97, 68/98, 66/99, 145/99, 30/2000, 116/2000, 163/2003, 17/2004, 110/2004, 141/2004, 150/2005, 153/2005, 129/2006, 117/2007, 25/2008, 60/2008, 69/2010, 126/2011, 112/2012, 19/2013, 80/2013, 148/2013, 69/2014, 87/2014 i 94/2014), ista je plaćena i poništena na dopuni zahtjeva.

Uputa o pravnom lijeku:

Ovo je rješenje izvršno u upravnom postupku te se protiv njega ne može izjaviti žalba, ali se može pokrenuti upravni spor pred upravnim sudom na području kojeg tužitelj ima prebivalište, odnosno sjedište. Upravni spor pokreće se tužbom koja se podnosi u roku od 30 dana od dana dostave ovog rješenja. Tužba se predaje nadležnom upravnom sudu neposredno u pisanom obliku, usmeno na zapisnik ili se šalje poštom, odnosno dostavlja elektronički.



DOSTAVITI:

1. OIKON d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju, Trg senjskih uskoka 1-2, HR-10000 Zagreb,
2. Državni zavod za zaštitu prirode, Radnička cesta 80, HR-10000 Zagreb, na znanje,
3. Uprava za inspekcijske poslove, Sektor inspekcijskog nadzora zaštite prirode, na znanje,
4. U spis predmeta

Prilog 3 Uvjeti na ICP-MS uređaju za native uzorke.

UVJETI NA ICP MS-u	
Rf-snaga	1180 W
Protok plina plazme	15,0 L/min
Protok plina raspršivača	0,94 L/min
Protok pomoćnog plina	1,20 L/min
Vrijeme integriranja	1500 ms
Točke po piku	20
Broj replika	5

Prilog 4 Granice detekcije i kvantifikacije na ICP-MS uređaju za native uzorke.

Metal	Granica detekcije - LOD (mg/kg)	Granica kvantifikacije - LOQ (mg/kg)
Cd	0,025	0,05
Ni	0,125	0,5
Zn	0,125	0,5
Pb	0,063	0,25

Prilog 5 Uvjeti na ICP-MS uređaju za transplantirane uzorke.

UVJETI NA ICP MS-u		
Raspršivač (Nebulizer)	MicroMist	
Komora za raspršivanje (Spray chamber)	Cyclonic	
Sučelje (Interface)	Pt cones	
Analizator masa (Mass analyzer)	Quadropole	
RF snaga	1,55 kW	
Način rada (Acq mode)	Spektar	
Obrazac pikova (Peak pattern)	1 točka	
Ponavljjanja (Replications)	3	
Sweep/replicate	100	
Sample uptake rate	0,4 rps	
Vrijeme stabilizacije (Stabilization time)	No gas	He
	10 s	5 s
Ion lenses mode	x-Lens	
Tune parameters	Standard tune	
Protok plina nosioca (Carrier gas)	1,07 L/min	
Protok plazme (Plasma gas)	14,99 L/min	
Aux gas	0,9 L/min	
Omega Bias	-80 V	
Omega Lens	8,4 V	

Prilog 6 Granice detekcije i kvantifikacije na ICP-MS uređaju za transplantirane uzorke.

Metal	Granica detekcije - LOD (mg/kg)	Granica kvantifikacije - LOQ (mg/kg)
Al	0,008	0,025
V	0,008	0,027
Cr	0,0050	0,0160
Mn	0,0060	0,0200
Fe	0,0020	0,0050
Co	0,0040	0,0120
Ni	0,0060	0,0190
Cu	0,0030	0,0100
Zn	0,0050	0,0170
As	0,0040	0,0150
Se	0,0090	0,0280
Mo	0,0050	0,0180
Ag	0,003	0,011
Cd	0,0030	0,0100
Ba	0,003	0,010
Pb	0,0030	0,0100
U	0,0003	0,001

Prilog 7 Zavisne varijable (a–m) i ekološki parametri (1–6) korišteni u izradi generalnog linearnog modela (GLM) za nativne lišajeve *F. caperata*.

Br.	Varijabla	Skraćenica	Jedinica	Raspon/ Kategorije	Bilješke
a	Sadržaj dušika (N)	N	mg/g dw	5,96–28,81	N= 59
b	Sadržaj sumpora (S)	S	mg/g dw	1,20–2,27	N= 59
c	Sadržaj nikla (Ni)	Ni	µg/g dw	1,74–14,1	N= 45
d	Sadržaj cinka (Zn)	Zn	µg/g dw	14,9–94,7	N= 45
e	Sadržaj kadmija (Cd)	Cd	µg/g dw	0,09–1,22	N= 45
f	Sadržaj olova (Pb)	Pb	µg/g dw	2,08–15,7	N= 45
g	Prva glavna komponenta vitalnosti lišajeva	F1	bez mjerne jedinice	–2,30–3,09	Faktor koji predstavlja pigmentne varijable (vidi Prilog 8)
h	Druga glavna komponenta vitalnosti lišajeva	F2	bez mjerne jedinice	–1,71–3,94	Faktor koji predstavlja varijable fluorescencije klorofila —NPQ i R _{Fd} (vidi Prilog 8)
i	Treća glavna komponenta vitalnosti lišajeva	F3	bez mjerne jedinice	–2,34–2,49	Faktor koji predstavlja varijable fluorescencije klorofila —q _p (vidi Prilog 8)
j	Četvrta glavna komponenta vitalnosti lišajeva	F4	bez mjerne jedinice	–3,13–2,04	Faktor koji predstavlja varijable fluorescencije klorofila —F _v /F _m (vidi Prilog 8)
l	Sadržaj protocetrarične kiseline (P.kis.)	P.kis.	mg/g dw	1,35–5,93	N= 84
m	Sadržaj usninske kiseline (U.kis.)	U.kis.	mg/g dw	0,40–2,4	N= 84
1	Udaljenost od rafinerije	d_ref	m	1273–17,358	Izračunato na razini plohe
2	Učestalost vjetra koji dolazi iz smjera rafinerije	w_frq	%	0,61–12,68	Izračunato na razini plohe iz podataka DHMZ-a (2010–2014)*
3	Prosječna brzina vjetra iz smjera rafinerije	w_spd	m/s	0,8–1,61	Izračunato na razini plohe iz podataka DHMZ-a (2010–2014)*
4	Gustoća vegetacije oko uzorkovanog stabla	v_den	bez mjerne jedinice	0–1	Mjereno na razini stabla: 0—nema vegetacije ispred uzorka, 0,25—malo vegetacije, 0,5—više vegetacije ispred uzorka ili dublje u otvorenoj šumi, 0,75—više vegetacije i dublje u šumi, 1—više od 5 m u šumi
5	Orijentacija lišajeva na stablu u odnosu na sjever	a_north	stupnjevi	0–180	Mjereno na razini uzorka: 0 = N, 45 = NW = NE, 90 = W = E, 135 = SW = SE, 180 = S
6	Orijentacija lišajeva na stablu u odnosu na smjer rafinerije	a_ref	stupnjevi	0–180	Mjereno na razini uzorka: 0—u smjeru rafinerije do 180—180° od smjera rafinerije

Prilog 8 Korelacije varijabli vitalnosti nativnih lišajeva s prve četiri glavne komponente (faktorska opterećenja; podebljane vrijednosti u plavim ćelijama označavaju bliske korelacije).

Izvorna varijabla	F1	F2	F3	F4
F_v/F_m	0.146234	0.039311	-0.045212	0.955048
NPQ	-0.038858	0.990609	0.095522	-0.013439
q_p	0.001545	0.107209	0.936257	-0.046996
R_{Fd}	-0.090071	0.989902	0.038800	0.057282
Ukupni klorofil	0.931957	-0.028932	-0.161093	0.103281
Kvocijent feofitinizacije	0.702255	0.016626	0.283879	0.222938
Ukupni karotenoidi	0.837803	-0.054406	-0.218257	-0.179146
Klorofil a/ klorofil b	0.783608	-0.145376	0.214141	0.230068

F_v/F_m , maksimalni prinos fluorescencije; NPQ, nefotokemijsko gašenje fluorescencije; q_p , fotokemijsko gašenje fluorescencije; R_{Fd} , stopa smanjenja fluorescencije; ukupni sadržaj klorofila (mg/g suhe tvari); kvocijent feofitinizacije; ukupni sadržaj karotenoida (mg/g suhe tvari); omjer klorofila a i klorofila b; F1, F2, F3 i F4, četiri faktora koja proizlaze iz analize glavnih komponenti (PCA).

Prilog 9 Korelacije varijabli vitalnosti transplantiranih lišajeva *F. caperata* (T1) s prve četiri glavne komponente (faktorska opterećenja; podebljane vrijednosti u plavim ćelijama označavaju bliske korelacije).

Izvorna varijabla	F1	F2	F3	F4
F_v/F_m	0,111990	-0,005714	0,916559	0,064980
NPQ	-0,031184	0,988309	-0,077011	0,085167
q_p	0,037945	0,113900	0,099419	0,980166
R_{Fd}	-0,043836	0,992623	-0,026817	0,052428
Ukupni klorofil	0,923909	-0,093881	0,227026	0,085878
Kvocijent feofitinizacije	0,737743	0,086076	0,294547	-0,104867
Klorofil a/ klorofil b	0,484254	-0,178850	0,628683	0,098643
Ukupni karotenoidi	0,927892	-0,061210	-0,019627	0,067723

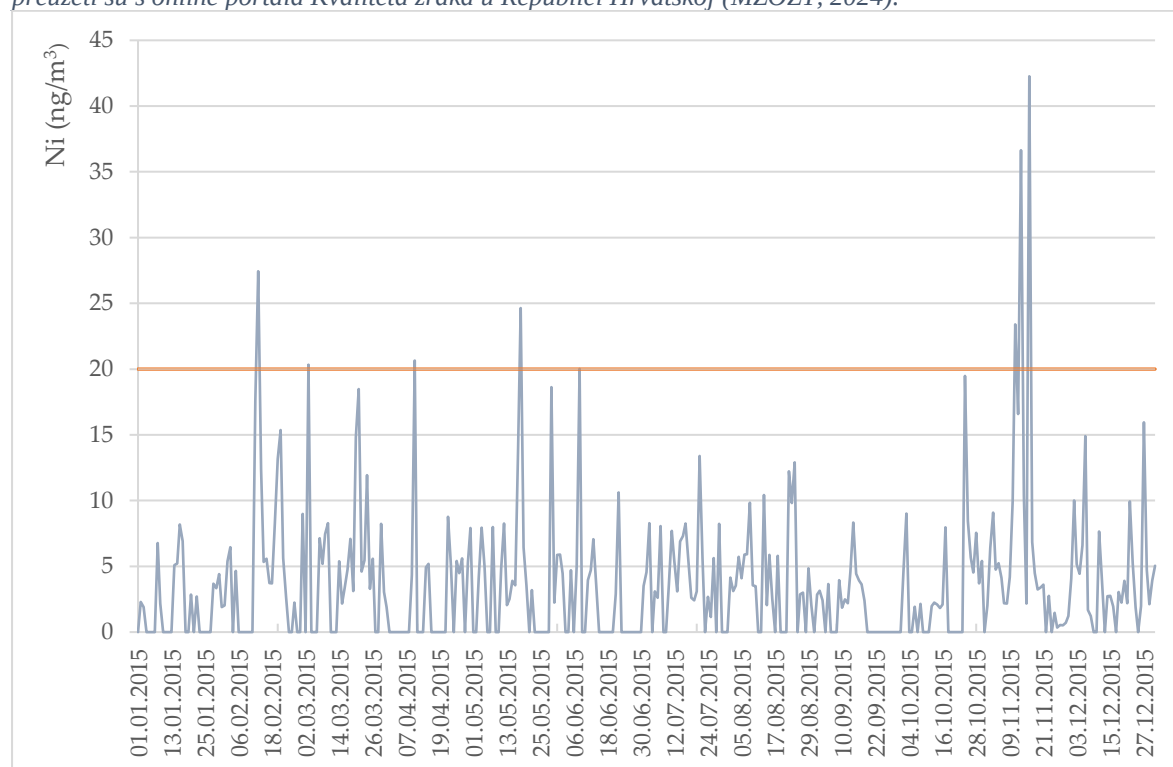
F_v/F_m , maksimalni prinos fluorescencije; NPQ, nefotokemijsko gašenje fluorescencije; q_p , fotokemijsko gašenje fluorescencije; R_{Fd} , stopa smanjenja fluorescencije; ukupni sadržaj klorofila (mg/g suhe tvari); kvocijent feofitinizacije; ukupni sadržaj karotenoida (mg/g suhe tvari); omjer klorofila a i klorofila b; F1, F2, F3 i F4, četiri faktora koja proizlaze iz analize glavnih komponenti (PCA).

Prilog 10 Korelacije varijabli vitalnosti transplantiranih lišajeva *E. prunastri* (T1) s prve četiri glavne komponente (faktorska opterećenja; podebljane vrijednosti u plavim ćelijama označavaju bliske korelacije).

Izvorna varijabla	F1	F2	F3	F4
Fv/Fm	0,260016	-0,293776	0,788254	-0,002501
NPQ	0,015033	0,991252	0,002962	0,037416
qp	0,154566	0,248312	0,817531	0,221701
R_{Fd}	-0,004914	0,990379	-0,021871	0,036144
Ukupni klorofil	0,965538	-0,044202	0,208533	-0,017812
Kvocijent feofitinizacije	0,852903	0,084963	0,091470	0,367897
Klorofil a/ klorofil b	0,233032	0,046482	0,154959	0,949154
Ukupni karotenoidi	0,917529	-0,018779	0,215003	0,147854

F_v/F_m , maksimalni prinos fluorescencije; NPQ, nefotokemijsko gašenje fluorescencije; q_p , fotokemijsko gašenje fluorescencije; R_{Fd} , stopa smanjenja fluorescencije; ukupni sadržaj klorofila (mg/g suhe tvari); kvocijent feofitinizacije; ukupni sadržaj karotenoida (mg/g suhe tvari); omjer klorofila a i klorofila b; F1, F2, F3 i F4, četiri faktora koja proizlaze iz analize glavnih komponenti (PCA).

Prilog 11 Vremenska dinamika prosječnih dnevnih koncentracija nikla (Ni) (ng/mg^3) u PM_{10} na mjernoj postaji Slavonski Brod-1 u 2015. godini, kada su započela ova mjerenja. Crvena linija predstavlja graničnu vrijednost za godišnji prosjek prema zakonodavstvu Europske unije i Republike Hrvatske. Podaci za izradu ovog grafikona preuzeti su s online portala Kvaliteta zraka u Republici Hrvatskoj (MZOZT, 2024).



9. ŽIVOTOPIS

Maja Maslač Mikulec (MBZ: -334018) je rođena u Zagrebu, gdje je završila školovanje. Titulu magistra eksperimentalne biologije stekla je 2012. na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, s diplomskim radom „Kvalitativna i kvantitativna analiza sekundarnih metabolita lišaja *Cladonia convoluta* (Lam.) Anders“. Od 2012. godine radi na poslovima zaštite prirode, u tvrtkama OIKON d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju (2012.-2013.; 2015.-2016.) i Geonatura d.o.o. – za stručne poslove zaštite prirode (2013.-2015.; 2016.-do danas), gdje je od 2019. godine Voditeljica grupe za istraživanje ptica. Bila je članica upravnog odbora Udruge BIOM od 2012. do 2014. godine, a od 2022. godine je u upravnom odboru Udruge Hyla. Članica je Hrvatskog botaničkog društva. Doktorski studij biologije upisala je 2014. godine i tijekom 2015.-2017. održavala vježbe kao naslovni asistent iz kolegija „Primjena GIS-a u biologiji“ i „Energetika ekosustava“. Godine 2016. završila je usavršavanje za „Voditelja izrade i provedbe projekata financiranih iz EU fondova“ (Algebra). Veći dio istraživanja za svoju doktorsku disertaciju izvodi u okviru projekta „Lišajevi kao bioindikatori zagađenja u okolišu (OkoLIŠ)“, koji je sufinancirala EU iz Europskog socijalnog fonda (ESF). Područja njezinog interesa uključuju lišajeve i ptice, s naglaskom na ekologiju i zaštitu te procjenu antropogenih utjecaja, GIS i daljinska istraživanja te popularizaciju znanosti. Do sada je objavila 4 znanstvena i 8 stručnih radova te 28 usmenih i posterskih priopćenja na 19 znanstvenih i stručnih skupova. Usavršavala se na 8 stručnih radionica, kao i na dva strana sveučilišta tijekom doktorskog studija (u Portugalu i Norveškoj). Sudjelovala je na brojnim manifestacijama popularizacije znanosti, a posebno se ističe organizacija prve „Noći biologije“ na Biološkom odsjeku PMF-a 2009. godine te vođenje radijske emisije „Znanost na eteru“. Također, koordinator je uspostave modula „Lišaji“ u sklopu Flora Croatica Database 2024. godine.

Popis znanstvenih radova:

Maslač Mikulec, M., Likić, S., Antonić, O., Tkalec, M., 2025. Any Way the Wind Blows Does Really Matter in Lichen Response to Air Pollution from an Oil Refinery. *Toxics* 13, 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxics13030160>

Gauslaa, Y., **Maslač Mikulec, M.**, Solhaug, K.A., 2021. Short-term growth experiments – A tool for quantifying lichen fitness across different mineral settings. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 282. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151900>

Jeričević, A., Gašparac, G., **Maslač Mikulec, M.**, Kumar, P., Telišman Prtenjak, M., 2019. Identification of diverse air pollution sources in a complex urban area of Croatia. J. Environ. Manage. 243, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.024>

Maslač, A., **Maslač, M.**, Tkalec, M., 2016. The impact of cadmium on photosynthetic performance and secondary metabolites in the lichens *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata* and *Evernia prunastri*. Acta Bot. Croat. 75, 186–193. <https://doi.org/10.1515/botcro-2016-0034>