



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Kanija MURATOVIĆ

VSEBNOST TEŽKIH KOVIN V TUNINI

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Kanija MURATOVIĆ

VSEBNOST TEŽKIH KOVIN V TUNINI

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

THE CONTENT OF HEAVY METALS IN TUNA MEAT

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Živilstvo in prehrana.

Komisija za 1. in 2. stopnjo študija Živilstva in prehrane je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Heleno Abramovič in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: prof. dr. Helena ABRAMOVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzent: prof. dr. Rajko VIDRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzent:

Datum zagovora:

Kanija Muratović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 637.56:597.556.334.111:543.272(043)=163.6
- KG tuna/težke kovine/arzen/živo srebro/kadmij/svinec/analizne metode/maksimalne dovoljene količine/dopustni tedenski vnos težkih kovin
- AV MURATOVIĆ, Kanija
- SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/VIDRIH Rajko (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2018
- IN VSEBNOST TEŽKIH KOVIN V TUNINI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
- OP VII, 21 str., 1 pregl., 2 sl., 39 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Tunina je vir več esencialnih hranil, vsebuje številne vitamine in minerale ter je bogata z nenasičenimi omega-3 maščobnimi kislinami zaradi česar velja za zdravo in kakovostno hrano. Vendar pa so raziskave pokazale, da vsebuje tunina tudi velike količine težkih kovin, kar potencialno ogroža človekovo zdravje. Arzen, kadmij, živo srebro in svinec so toksični elementi, ki se pogosto akumulirajo v mesu rib, kar lahko ob prevelikem vnosu vodi do zdravstvenih težav. Evropska komisija je v dokumentu No 1881/2006 tako določila maksimalne vrednosti, ki so dovoljene za težke kovine. Meja za vsebnost živega srebra je 1 mg/kg tunine, za svinec je 0,3 mg/kg tunine ter za kadmij 0,1 mg/kg tunine. V obravnavanih raziskavah za večino vzorcev niso zaznali prekoračenih maksimalnih dovoljenih količin v mesu rib. Tune, ki so vsebovale previsoke koncentracije težkih kovin, so bile ujete na industrijsko razvitem, onesnaženem in vulkansko aktivnem območju. V raziskavah so potrdili povezavo med velikostjo ribe in akumulacijo težkih kovin. Literaturni podatki kažejo, da je z velikostjo ribe koncentracija težkih kovin višja. Kljub temu, da je vsebnost toksičnih elementov, ki so jih določili v tunini, pod postavljeno mejo, priporočajo raziskovalci zmerno uživanje ribjega mesa, da ne pride do prekoračitve dopustnih tedenskih vnosov težkih kovin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 637.56:597.556.334.111:543.272(043)=163.6
- CX tuna fish/heavy metals/arsen/mercury/cadmium/lead/analytical methods/maximum allowable limits/tolerable weekly intake
- AU MURATOVIĆ, Kanija
- AA ABRAMOVIČ Helena (supervisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2018
- TI THE CONTENT OF HEAVY METALS IN TUNA MEAT
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes): Field Food Science and Nutrition
- NO VII, 21 p., 1 tab., 2 fig., 39 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Tuna fish is a source of more essential nutrients, contains vitamins and minerals, and is rich in unsaturated omega- 3 fatty acids. Therefore, fish are considered as healthy and good quality food. However, research shows that in addition to all benefits that consumption of tuna meat shows, tuna also contain large quantities of heavy metals that can potentially threaten human health. Arsenic, lead, cadmium and mercury are toxic elements, which are often accumulated in fish meat. The European Commission has therefore set maximum concentration limits for heavy metals in document: No 1881/2006. The limit for total mercury is 1 mg/kg of tuna, lead is 0.3 mg/kg of tuna and for cadmium is 0.1 mg/kg of tuna. According to studies, in most samples, maximal allowed quantities in fish meat were not exceeded. Samples, which contained excessive concentrations of heavy metals, were obtained from fish caught in a polluted and volcanic active area. Research has confirmed the correlation between the fish size and the accumulation of heavy metals. According to literature data, a higher concentration of heavy metals was detected in adult fish. Despite the fact that toxic elements in the tuna are detected below the limit, researchers recommend moderate consumption of fish meat in order to avoid excess of tolerable weekly intake.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
1 UVOD	1
2 TUNA	2
2.1 FIZIOLOGIJA TUN	2
2.2 ŽIVLJENSKI CIKEL	3
2.3 RIBOLOV	4
3 TEŽKE KOVINE V TUNINI IN NJIHOV VPLIV NA ZDRAVJE	6
3.1 SVINEC	6
3.2 KADMIJ	7
3.3 ARZEN	8
3.4 ŽIVO SREBRO	9
4 DOLOČANJE TEŽKIH KOVIN	10
4.1 ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA	10
4.2 INDUKTIVNO SKLOPLJENA PLAZMA Z MASNO SPEKTROMETRIJO	11
4.3 PRIPRAVA VZORCA IN IZVEDBA ANALIZE	11
4.3.1 Suhi sežig	12
4.3.2 Kislinski razklop v mikrovalovni pečici	12
5 RAZISKAVE	13
6 ZAKLJUČEK	17
7 VIRI	18

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracije maksimalnih dovoljenih količin za Pb, Cd, As ter skupni in organski Hg v tunini (mg na kg tunine), koncentracije dopustnega tedenskega vnosa (TWI; mg na kg telesne teže) (Commission Regulation (EC) No 1881/2006) ter koncentracije Hg, Pb, Cd in As v tunini (podane v mg na kg tune) določene v raziskavah (DiBella in sod., 2015; Mol, 2011; Pastorelli in sod., 2012; Torres in sod., 2016). 16

KAZALO SLIK

Slika 1: Modroplavuti tun (EC, 2018). 2
Slika 2: Ribolovna območja (Csirke, 2005). 5

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
ALA	alfa linolenska kislina
DHA	dokozaheksaenojska kislina
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (angl. European Food Safety Authority)
EPA	eikozapentaenojska kislina
FAAS	plamenska atomska absorpcijska spektrometrija (angl. flame atomic absorption spectrometry)
FAO	Organizacija združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
ICP	induktivno sklopljena plazma (angl. inductively coupled plasma)
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma- masna spektrometrija (angl. inductively coupled plasma)
ICP-OES	induktivno sklopljena plazma- optična emisijska spektrometrija (angl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry)
MALs	maksimalne dovoljene količine kovin (angl. allowable limits)
TWI	koncentracija dopustnega tedenskega vnosa (angl. tolerable weekly intake)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

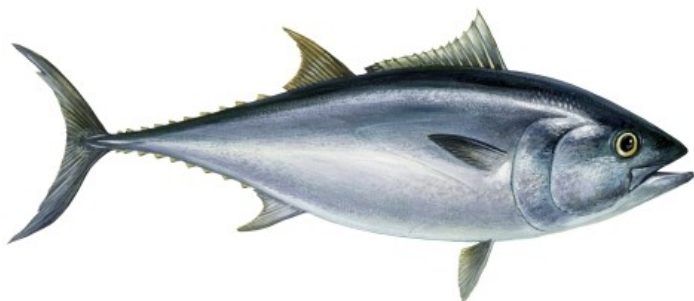
1 UVOD

Omega-3 maščobne kisline zasedajo pomembno mesto med nenasičenimi maščobnimi kisljinami. Med nje uvrščamo alfa-linolensko kislino (ALA), eikozapentaenojsko kislino (EPA) in dokozaheksaenojsko kislino (DHA). Vse tri so pomembne za razvoj ploda, preprečujejo bolezni srca in ožilja, Alzheimerjevo bolezen, imajo protivnetne učinke in izboljšujejo celične funkcije (Swanson in sod., 2012). Ker so omega-3 maščobne kisline esencialne, pomeni, da jih človeško telo ne more samo proizvajati iz drugih spojin, zato je izjemoma pomemben zadosten vnos preko hrane. Tako glavni vir omega-3 maščobnih kislin predstavljajo ribe, predvsem so to tune, skuše, postrvi in sardine. Toda kljub temu, da ribe predstavljajo dober vir nenasičenih maščobnih kislin in ostalih biološko pomembnih snovi, lahko zdravju tudi škodujejo. Znano je namreč, da se v mesu plenilskih rib akumulirajo težke kovine, ki pa ob visokem vnosu v telo lahko negativno vplivajo na zdravje (Bosh in sod., 2016).

Diplomsko nalogo začnjam s splošnim opisom same ribe. Spoznali bomo nekaj o fiziologiji tun, življenjskem ciklu (oploditev, odrašanje, razmnoževanje), kako se je skozi zgodovino spreminjala količina ter vrsta ulovljene tune in kateri kraji so najpomembnejši za njihov ulov. Sledil bo opis štirih najpogosteje najdenih težkih kovin v tunini. To so živo srebro, kadmij, arzen in svinec. Vse štiri kovine so toksične in ob prevelikem vnosu lahko vodijo do zdravstvenih okvar. V nadaljevanju podajam možne negativne posledice prevelikih vnosov težkih kovin, maksimalne dovoljene količine težkih kovin v ribjem mesu ter vrednosti dopustnega tedenskega vnosa. Posebno poglavje bo namenjeno metodam določanja težkih kovin (kako se vzorec odvzame, pripravi na samo analizo in opis možnih detekcijskih instrumentov). Del diplomske naloge je namenjen poglobitvi v objavljene študije, pri čemer bom povzela dano raziskavo ter predstavila in komentirala dobljene rezultate.

2 TUNA

Latinsko ime za tuno tj. *Thunnus* naj bi prvotno izviralo iz grške besede »thynnos«, kjer »thyno« pomeni hiteti, švigati kot puščica, kar je nedvomno tunin simbol. Najdemo jih skoraj v vseh oceanih in morjih, kar nam pove, da so te živali dobri in zelo hitri plavalci, ki lahko med lovom dosežejo hitrost celo do 72 km/h. Visoka hitrost, ki jo lahko dosežejo, jih naredi izjemne plenilce. Razlog zakaj ta rod najdemo od toplih do hladnih voda, je ta, da so sposobni ohraniti svojo telesno temperaturo ne glede na temperaturo okolice oziroma vode. Tako lahko preživijo v globokih vodah vse do 1000 m pod površino morja. Običajno se tune zadržujejo na globini od 30 m pa do nekje 500 m, odvisno od vrste tun. Na primer tun Albakor ali dolgoplavuti tun se običajno nahaja na 250-300 m, medtem ko se modroplavuti tun nahaja med 30-50 m (Johnson, 2006; Gardieff, 2005).



Slika 1: Modroplavuti tun (EC, 2018).

Biologi jih uvrščajo med družino skuš (*Scombrinae*), kamor spadajo tune, skuša, bonito ter kraljevska skuša. Ožja klasifikacija jih uvršča med pleme *Thunnini*. Znotraj plemena je znanih pet rodov tun, in sicer *Allothunnus*, *Auxis*, *Euthynnus*, *Katsuwonus* in *Thunnus* (Graham in Dickson, 2004).

Najbolj razširjen rod je *Thunnus*, med katere spadajo naslednje vrste:

- tun albakor ali dolgoplavuti tun (*Thunnus alalunga*),
- rumenoplavuti tun (*Thunnus albacares*),
- modroplavuti tun (*Thunnus thynnus*),
- velikooki tun (*Thunnus obesus*),
- črnoplavuti tun (*Thunnus atlanticus*),
- pacifiški modroplavuti tun (*Thunnus orientalis*),
- *Thunnus tonggol* ter
- *Thunnus maccoyi*.

2.1 FIZIOLOGIJA TUN

Tuna je riba z aerodinamično obliko, kjer je na sredini njeno telo krepko, na obeh koncih pa se zožuje v dve točki. Hrbtna stran je običajno temno modre, kovinske barve medtem

ko je trebušna stran belkasto srebrne. Na hrbtu ima dve večji, tesno razporejeni hrbtni plavuti, po katerih je mogoče ločiti vrste tun. Celotno hrbtno stran pa poleg dveh hrbtnih plavuti prekriva še 7 do 10 manjših plavuti (angl. finlets), ki se zaključijo pri repu. Najdemo jih tudi na spodnji strani oziroma trebušni strani ribe, od spodnje plavuti dalje pa vse do začetka repa. Na telo se veže rep preko repnega peclja, ki je pri tunah zelo tanek, saj se ravno tu nahajajo izrastki oz. mehanizmi (angl. keels), ki skrbijo za stabilizacijo tun. Le ta se na koncu zaključijo v obliki polmesca (Gardieff, 2005).

Dihalni organ, ki ga uporabljajo ribe so škrge, ki ležijo v škržni votlini, ta pa se nahaja tik pod škržnimi poklopci. Škrge so pripete na škržne loke v obliki vlaken, katera so dodatno nagubana. Imenujemo jih škržne lamele. S tem je povečana sama površina škrge, kar pomeni boljšo izmenjavo plinov, ki poteka preko sten kapilar v lamelah. Tako površina škrge lahko nekajkrat preseže telesno površino ribe (ZZRS, 2009). Preko škrge pridobljeni kisik v srce tune, kjer se nato prenese naprej po žilah v ostalo tkivo, pri čemer se kri segreje in posledično segreje tudi preostali del telesa. Ob nenadnem potopu v globine se njihovo srce lahko ohladi za 15 °C v samo nekaj minutah, saj kri ki vstopi v srce prihaja iz škrge ter odraža temperaturo morja. Pri večini živali bi taka sprememba temperature ustavila bitje srca, toda pri tuni ne. Znanstveniki predvidevajo, da razlog tiči v adrenalinu, ki stimulira električno aktivnost srčnih celic in vzdržuje srčni utrip. Adrenalin se namreč začne sproščati ob stresu, ki ga tune doživijo ob nenadni spremembi okoliške temperature. Tune tako s svojim edinstvenim metabolizmom, spadajo med endotermne organizme (Shiels in sod., 2014).

2.2 ŽIVLJENSKI CIKEL

Odrasla tuna spolno dozori pri starosti od približno 3 do 5 let in je tako pripravljena na paritev. Samica lahko sprosti tudi do 100.000 jajčec na 1 kg telesne teže. Kar pomeni, da 20 kilogramska samica sprosti 2 do 3 milijonov jajčec. V roku 30 ur se jajčeca izvalijo, toda le nekatera uspejo preživeti in se tako razviti do odrasle dobe. Po izvalitvi rastejo približno 1 mm/dan, odvisno od vrste. Tako po 10 dneh merijo približno 5,80 mm, po 20 dneh pa cca. 10,62 mm. Pospešeno rast je opaziti šele po 20 dneh od izvalitve, in sicer 2,10 mm/dan (Johnson, 2006).

Vse je seveda odvisno od posamezne vrste. Rumenoplavuti tun je na primer značilen po svoji hitri rasti in razvoju, po zgodnjemu dozorevanju ter po visokem vnosu energije za razvoj spolnih organov. Tun albakor pa za razliko od rumenoplavutega tuna počasneje raste, se razvija, dozoreva ter vlagata manj energije za spolni razvoj. Vse do nekje 3 – 4 leta starosti se samice in samci med seboj neznatno razlikujejo. Pri določeni starosti pa postajajo samci vse večji od samic. Razmnožujejo se enkrat letno in sicer v toplejših oziroma poletnih mesecih, vse od aprila pa do septembra, odvisno od same vrste tuna. Značilno je to, da se pari v toplejših vodah, od junija do septembra na severni polobli ali od oktobra do marca na južni polobli. Življenjska doba tune je lahko zelo dolga, odvisno od morja v katerem se nahaja in od same vrste. Na primer modroplavuti tun v povprečju živi 15 let, lahko pa doseže tudi med 20 in 30 let. Med tem, ko je za tuno albakor znano, da v Sredozemskem morju živi povprečno 9 let, v Atlantskem oceanu pa približno 13 let. Ne

glede na hitrost razvoja in velikost telesa samice običajno živijo dlje časa od samcev (Hwang, 2005).

Ribe lahko delimo tudi glede na to, pri kateri globini se naseljujejo v morju oziroma oceanu. Tuni spadajo med tiste ribe, ki naseljujejo dvoje globinskih območij in sicer epipelagično ter mezopelagično območje. Prvo območje predstavlja pas od površja morja pa do globine 200 m, drugo območje pa do 700-1000 m globine. Najdemo jih v vseh oceanih po vsem svetu, razen v polarnih morjih. So ribe, ki letno prepotujejo krajše in daljše razdalje, celo prekooceanske (Gardieff, 2005). Na primer, modroplavuti tun v juniju prispe do severovzhodne obale ZDA in odide pozno jeseni proti jugu. To vrsto lahko najdemo najbolj visoko na severu vse do Nove Fundlandije in Labradorja in to samo v poletnih mesecih. Nato tun v zimskih mesecih potuje proti jugu tudi do 40 stopinj geografske širine južno od ekvatorja. Zanj je značilno to, da lahko prečka Atlantski ocean v 60 dneh, saj je eden izmed najhitrejših tun, ki lahko doseže hitrost 70 km/h. Severne vode pa jim omogočajo bogato področje lovljenja, kjer lahko shranjujejo energijo v obliki maščevja in se tako pripravijo na potovanje proti jugu (Johnson, 2006). Za tuna vrste albakor značilno, da potujejo v velikih jatah, ki jo poleg njihove vrste sestavljajo še modroplavuti in rumenoplavuti tun. Te jate se običajno oblikujejo v okolici lebdečih objektov kot je na primer skupek morske trave (Hwang, 2005).

Tune dosegajo zelo visoke hitrosti, kar jih tudi naredi izjemne plenilce. Odvisno od zastavljenega plena, uporabijo različne strategije. Hitro in energično za lov večjih rib ter umirjeno (angl. modified filter feeding), za lov manjših in počasnejših organizmov (Johnson, 2006). Tune so selitveni plenilci, ki zasedajo visok trofični nivo v morskih ekosistemih in s tem predstavljajo velik vpliv oziroma donos ribiški industriji. V mnogih člankih so znanstveniki pokazali, da ribe plenilci, ki zasedajo visoke nivoje v morskih ekosistemih, vsebujejo višjo vsebnost težkih kovin (med njimi najbolj izstopajoča je živo srebro), ki se lahko akumulirajo v tkivo plenilcev preko prehranske verige. Prav tako poročajo o raziskavah, ki kažejo na pozitivno korelacijo med vsebnostjo Hg v mišicah tun ter med samo velikostjo tune (Chen in sod., 2014).

2.3 RIBOLOV

Od 19. stoletja se je tradicionalen ribolov tun začel prenašati po različnih delih sveta. Običajno so bila ribolovna območja lokalna ter splošno so se nahajala v bližini obal. Najrazvitejša območja so bila v tistem času Atlantski ocean, Biskajski zaliv, ribolov s pastmi je bil razvit na Gibraltarju in ob obali severne Afrike. Nekaj ribolova je bilo razvitega tudi v Sredozemskem morju, ob obalah otokov v Tihem oceanu, ob obalah Južne Amerike ter v Indijskem oceanu. Zaradi vse večjega povpraševanja po konzervirani tunini, se je v med letoma 1940 in 1950 začelo industrializirano ribištvo. Državi, kot so Severna Amerika in Japonska, sta postali vodilni v lovu na tuno. Konec 50. let so japonska ribiška plovila prevzela Atlantski ocean in povečini lovila tun albakor in rumenoplavuti tun, ki sta bila namenjena konzerviranju. S časoma so se začele razvijati tudi evropske ribolovne industrije in pričele prevzemati kontrolo nad Atlantikom. Prav tako so vse države napredovale v tehnikah ribištva in napredovale od tradicionalnega ribištva s trnkom do današnje najbolj pogoste uporabljene tehnike lova »purse seine«. Ob razvoju hladilnic so

nekateri ribiške industrije (predvsem Japonske) prešle iz lova rumenoplavutega tuna, ki je bil predvsem namenjen za konzerviranje, na velikookega tuna, ki je namenjen za prodajo kot sveže meso (zrezki, sushi). Tako se je lov na te ribe skozi leta postopoma povečeval, do točke, ko se je na trgu pojavila prevelika ponudba tun in so tako v 80. in 90. letih začeli uveljavljati regulativne ukrepe za ribolov tun. Razvijale so se organizacije za upravljanje ribištva, ki so postavljali predpise in z njimi vplivali na paleto ribolova ter najpomembneje na delež ulova v državi. Danes je industrijski ribolov tun zelo dinamičen in visoko razvit, pripravljen na hitre spremembe na živilskem trgu potrošnikov. Tune imajo hitro rast in visoko plodnost, kar se odraža v hitrem pridobivanju mase in hitrem razmnoževanju. To sta lastnosti, ki ju svetovno ribištvo s pridom izkorišča (FAO, 2011).

Food and Agriculture Organizations of the United Nations (FAO) je svetovna organizacija, ki je ribolovno območje tun razdelila v skupine glede na geografsko lego, kot je razvidno s slike 1. Od leta 1950 je Pacifiški ocean predstavljal največje ribolovno območje črtastega in rumenoplavutega tuna. V sredini osemdesetih let se je postopoma pričel večati ulov na področju Atlantskega oceana in Mediteranskega morja, na območju Indijskega oceana pa se je industrializiran ribolov začel intenzivno razvijati najkasneje, in sicer v poznih 80ih letih. Japonska, Filipini in Indonezija so države, ki trenutno predstavljajo največji ulov tunine (FAO, 2011).

Tun albakor, velikooki tun, modroplavuti tun, črtasti tun in rumenoplavuti tun predstavljajo glavne vrste globalnega ribolova tun. Po podatkih je v letu 2015 bilo skupno ulovljeno 4,8 milijonov ton tunine, od tega največji delež tj. 58 % ulovljene vrste predstavlja črtasti tun, z 27 % mu sledi rumenoplavuti tun, nato velikooki z 9 % ulova, albakor s 5 % ter nazadnje modroplavuti tun z 1 % (ISSF, 2017).



Slika 2: Ribolovna območja (Csirke, 2005). Legenda: 18 (Arktični ocean), 21 (Atlantski ocean, severozahod), 27 (Atlantski ocean, severovzhod), 31 (Atlantski ocean, zahod), 34 (Atlantski ocean, vzhod), 37 (Sredozemsko in Črno morje), 41 (Atlantski ocean, jugozahod), 47 (Atlantski ocean, jugovzhod), 48 (Atlantski ocean, sever), 51 (Indijski ocean, zahod), 57 (Indijski ocean, vzhod), 58 (Indijski ocean, jug), 61 (Tihi ocean, severozahod), 67 (Tihi ocean, severovzhod), 71 (Tihi ocean, zahod), 77 (Tihi ocean, vzhod), 81 (Tihi ocean, jugozahod), 87 (Tihi ocean, jugovzhod), 88 (Tihi ocean, jug).

Komercialni ribolov izkorišča pet primarnih vrst lovljenja tun, in sicer longline, gillnet, pole and line, purse seine in troll. Katero vrsto lova pa bodo ribiči izvedli je odvisno od vrste tun, ki jo lovijo. Metoda purse seine, ki v prvi vrsti zagotavlja ulov rumenoplavutega in črtastega tuna, predstavlja 63 % globalnega ulova tun vsako leto. Ribiška mreža, ki visi vertikalno v vodo in ima spodnji del pričvrščen z obroči ter zgornji del z bojami, je postavljena v sklenjen krog in ob dvigu mreže proti površini se obroči na dnu mreže na vsaki strani približujejo drug drugemu in tako mrežo zaprejo v kateri ostane ujet plen. Predstavljena metoda je dosledna in učinkovita, ki ribičem omogoča ulov velikih količin hkrati in prenos do 2000 ton tune do skladišč (ISSF, 2017).

3 TEŽKE KOVINE V TUNINI IN NJIHOV VPLIV NA ZDRAVJE

Ribe veljajo za zdravo in kakovostno hrano, predvsem zaradi bogatih komponent, ki oskrbujejo telo z esencialnimi hranili, kot so visoko kakovostni proteini, številni vitamini in minerali ter nenasičene omega-3 maščobne kisline. Tako zdravniki in nutricionisti priporočajo, da jih uživamo najmanj dvakrat tedensko. Toda kljub temu, da imajo ribe in morski sadeži mnoge pozitivne učinke na zdravje, lahko prav tako predstavljajo precejšnje nevarnost. Kovine in polkovine se pogosto akumulirajo v meso rib kar lahko ob prevelikem vnosu vodi do okvar zdravja. V kakšni količini pa se bodo težke kovine akumulirale v tkiva rib, je odvisno od onesnaženosti okolja v katerem se organizem nahaja, od bioloških faktorjev posamezne vrste in od kemijske vrste težke kovine. Raziskave so pokazale, da se različne kovine akumulirajo različno znotraj iste vrste rib, ter da, se specifična kovina akumulira v različnih količinah znotraj posameznih tkiv enega organizma oziroma ribe (Bosh in sod., 2016).

Vedeti moramo tudi to, da niso vse kovine in polkovine škodljive ribam oz. ljudem. Nekatere so celo esencialne za človekovo zdravje. Tako jih lahko razvrščamo med esencialne, ne esencialne in toksične kovine. Med esencialne spadajo železo (Fe), baker (Cu), cink (Zn) in selen (Se). V drugo skupino ne esencialnih kovin spadajo kovine, ki nimajo znanega specifičnega učinka v telesu, toda niso obravnavane kot toksične. Krom (Cr), nikelj (Ni), kadmij (Cd), živo srebro (Hg) in svinec (Pb) so elementi toksične skupine, ki imajo lahko škodljive učinke na žive organizme v primeru uživanja visokih koncentracij. Vsaka kovina, ne glede na skupino v katero spada, ima svojo stopnjo strupenosti. Določene so tudi maksimalne dovoljene količine kovin v proizvodih in/ali svežem tkivu (MALs) in koncentracije dopustnega tedenskega vnosa (TWI), pri katerih človeško zdravje še ni ogroženo (Bosh in sod., 2016). Za morske ribe je značilno, da vsebujejo zelo visoke količine kovin kot so As, Cd, Hg in Pb, ki pa imajo potencialne škodljive posledice za potrošnike.

3.1 SVINEC

Svinec v naravi lahko poiščemo v zemlji, kamnih ter hidrosferi (morja, reke, jezera, podzemne vode itd.). Poleg tega, da je svinec ena izmed najširše uporabljenih kovin (za akumulatorje, strelivo, izdelavo katodnih zaslonov, ...), je njegova toksičnost odvisna od kemijske oblike v kateri se nahaja. Organske oblike veljajo za toksične, medtem ko za

anorganske velja nasprotno. Tako morja predstavljajo značilen vir toksične oblike Pb, kar pomeni veliko izpostavljenost morskih organizmov ter ob pogostem uživanju morskih jedi se lahko tudi te akumulirajo v človeško telo (Bosh in sod., 2016).

Ljudje smo lahko svincu izpostavljeni preko zraka, hrane, prahu ter zemlje. Zaužita hrana predstavlja najpogostejši vnos svinca v telo, v primeru otrok pa je vstop najpogostejši preko kontakta (zemlja in prah). Kovina se v prehranjevalni verigi lahko pojavi, kot že omenjeno, preko uživanja morske hrane ali pa preko zelenjave in sadja gojenega na onesnaženi zemlji (Bosh in sod., 2016). Žitni izdelki, krompir, mešane jedi na osnovi žit, listnata zelenjava in vodovodna voda so bile opredeljene kot glavne snovi, ki prispevajo k izpostavljenosti svincu (EFSA, 2010). Na človeško telo lahko svinec deluje akutno ali kronično strupeno. Simptomi akutne zastrupitve so slabost, bolečine v trebuhu, bruhanje, diareja ter krvav urin, medtem ko so motnje vida, motnje sluha, vpliv na živčevje, rodila in sečila simptomi kronične zastrupitve. Vpliv ima tudi na presnovo vitamina D, tvorbo hemoglobina ter na delovanje ledvic. Pomembno je, da ne pride do stika med kovino ter otroci do 6. leta starosti, saj so ti zaradi razvoja in hitrejše absorpcije hranil še bolj izpostavljeni toksičnim učinkom. Zdi se, da je absorpcija zaužitih topnih svinčevih spojin višja pri otrocih kot pri odraslih. Posledice so lahko naslednje: nižji inteligenčni kvocient, spremembe obnašanja, slabša učna sposobnost, nasilnost ter slabša motorična koordinacija. Poleg otrok predstavljajo tudi nosečnice ranljivo skupino s posledicami zgodnjega poroda, nizke telesne teže otroka ter prehod svinca v materino posteljico (predporodna izpostavljenost zarodka) (Blaznik, 2011). Absorpcija inhaliranih delcev se pojavlja v dihalnih tkivih, medtem ko se večji delci prenesejo v žrelo in pogoltnejo. Ko je svinec absorbiran, se po krvi prenaša znotraj eritrocitov in se nato prenese v mehka tkiva (najpogosteje jetra in ledvice) in kostna tkiva, kjer se s časom kopiči. Tako nam koncentracije svinca v kosteh in zobeh lahko omogočijo informacije o predhodni izpostavljenosti, medtem ko nam krvni nivo svinca poda informacije o trenutni izpostavljenosti (EFSA, 2010).

EFSA je leta 2010 s pomočjo nadzornega odbora CONTAM določila, da dopustni tedenski vnos 25 μg svinca/kg telesne teže, ki ga je določil strokovni odbor FAO/WHO, ni več primeren zaradi primanjkovanja dokazov za številne kritične dejavnike. Pri sedanjih dopustnih količinah izpostavljenosti svinca je klinično tveganje odraslih potrošnikov zanemarljivo nizko. Še vedno pa sedanje koncentracije izpostavljenosti svinca predstavljajo potencialno skrb v primeru nosečnic in otrok (EFSA, 2010).

3.2 KADMIJ

Glavni viri kadmija v okolju so naravni pojavi (vulkanski izbruhi, preperevanje kamnin), onesnaževanje okolja z industrijo (rudarstvo, kovinska industrija, odlagališča odpadkov) in uporaba umetnih kmetijskih gnojil. Kadmij se običajno nahaja v anorganski obliki kot Cd^{2+} . Z lahkoto lahko prečka celično membrano in ko je v notranjosti žive celice ima visoko afiniteto do ligandov in tvori stabilnejše komplekse. Na primer, v mišičju rib večina kadmija tvori s proteini stabilne komplekse. Kadmij lahko vstopi v telo ribe preko pasivne difuzije skozi škrge ali preko prehranjevalne verige (planktoni, mikroorganizmi). Morski organizmi prevzamejo kadmij v njegovi prosti obliki Cd^{2+} , toda prisotnost soli v morski

vodi povzroči, da prost Cd^{2+} zlahka tvori kompleksa s klorovimi ioni, CdCl_2 in CdCl^+ , kar naj bi zmanjševalo akumulacijo kadmija v tkivu rib (Bosh in sod., 2016).

Kakšen vpliv ima kadmij na človeško telo? Kovina je visoko toksična za človeka predvsem zaradi svoje dolge biološke razpolovne dobe. Posledice izpostavljenosti kadmiju na zdravje vključujejo hipertenzijo in kardiovaskularno funkcijo, nevrološke motnje, rakotvorne učinke ter skeletne šibkosti in napake. Zaradi tvorbe stabilnih kompleksov med kadmijem in kalcijem, je lahko moteno delovanje kalcija, kar posledično privede do njegove izgube in tako do osteoporoze ter motenih regulacijskih procesov v celici (regulacija srca in krčenja mišic, krvnega pritiska, stabilizacija permeabilnosti membran in celične strukture,...). Ljudje smo kovini predvsem izpostavljeni preko hrane, predvsem so to ribe, meso in sadje. Evropska komisija je določila dovoljen tedenski vnos kadmija na 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne teže ter določila maksimalne dovoljene količine kadmija v ribah na 0,1 mg/kg . Njegovo toksičnost v črevesju lahko zmanjšamo z uživanjem naslednjih elementov kot so železo, cink, baker ter vitamin C in D3. Naravno kadmij ni prisoten v hrani (rastlinski in živalski), ampak je posledica onesnaženosti tal in/ali vode. Poleg morskih organizmov, so kadmiju izpostavljene tudi rastline. Dobri akumulatorji kadmija so krompir, špinača, pšenica in glive. V telo pride kar 70 % kadmija preko rastlinske hrane. V veljavi je evropski predpis za mejne vrednosti kadmija v naslednjih živilih: meso, drobovina govedi, konj, ovac, svinj, perutnine, mišičnina rib, raki, školjke, glavonožci, žito, soja, zelenjava, sadje, gobe in prehranska dopolnila (Bosh in sod., 2016).

3.3 ARZEN

Arzen je v različnih spojinah prisoten v zemeljski skorji, zato ga pogosto najdemo v vodi, zlasti v podzemni. V naravi je prav tako razširjen zaradi ekoloških vzrokov in onesnaževanja, ki ga povzroča ljudstvo. Je polkovina, ki je lahko prisotna v organskih ali anorganskih oblikah katere se med seboj razlikujejo v stopnji toksičnosti. Najbolj strupen arzen je anorganske oblike, saj je v tej obliki stabilen in vodotopen ter se tako lažje absorbira v prebavnem traktu, trebušni votlini in mišicah v človeškem telesu. Obratno velja za organski arzen, ki se iz telesa hitro izloči in posledično tudi ne akumulira. Organski arzen prvotno najdemo v ribah in mesu, anorganski pa kot sem že prej omenila v vodah. Čeprav morska hrana lahko vsebuje nekajkrat višjo vsebnost As v primerjavi z ostalo hrano, je v veliki verjetnosti podana koncentracija skupnega As ne pa anorganskega oziroma toksičnega. Raziskave so pokazale, da do 90 % arzena v ribjih mišicah predstavlja ne strupena oblika (Bosh in sod., 2016). Čeprav je možna izpostavitve arzenu tudi preko dotika in vdihavanja, še vedno ostajata hrana in pitna voda glavna načina izpostavljenosti. Hrana, posebno procesirana zrnata živila, kot so pšenični kruh ter riž, mleko in mlečni izdelki ter pitna voda so glavni izviri izpostavljenosti arzenu. Druge skupine živil, ki prav tako prispevajo k dnevni izpostavljenosti anorganski obliki arzena so ustekleničene vode, kava in pivo, riževa zrna in izdelki na osnovi riža ter ribe in zelenjava, še posebej alge (EC, 2017).

Zgodnji simptomi izpostavljenosti arzenu so bolečine v trebušni votlini, bruhanje, mišična slabost in rdečica. Kronična izpostavljenost pa lahko vodi do kožnih bolezni in nastanka raka (Bosh in sod., 2016). Leta 2010 je EFSA objavila izvedeno raziskavo glede

dovoljenega tedenskega vnosa anorganske oblike arzena. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) je predhodno postavila meje za dovoljen tedenski vnos na 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne teže, toda v izvedeni raziskavi EFSE se je izkazalo, da postavljena meja ni več primerna. Rezultati so namreč pokazali, da anorganski arzen pri teh koncentracijah povzroča kožnega in pljučnega raka ter, da so celo nižje izpostavljenosti povzročale številne škodljive učinke. Določitev razmerja med anorganskim in organskim arzenom v različnih skupinah živil, je zaradi maloštevilnih reprezentativnih podatkih težko določljivo (EFSA, 2009).

3.4 ŽIVO SREBRO

Živo srebro je kovina, ki je pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju, prisotna je v različnih kemijskih oblikah in v različnih komponentah v okolju ter je kovina, ki se zlahka akumulira v ribje tkivo in ob prevelikem vnosu v telo, predstavlja nevarnost za človeško zdravje. Morska hrana predstavlja primarni vir živega srebra v človeškem telesu (Bosh in sod., 2016).

Koncentracije živega srebra v okolju so se v 20 stoletju pričele zviševati in sicer zaradi naravnih procesov kot so gozdni požari in vulkanski izbruhi ter največ zaradi človeškega vpliva (onesnaževanje). Uporaba kovine je precej razširjena od uporabe pri izdelavi barv, električne opreme, baterij ter do uporabe v medicini, zobozdravstvu ter vojski. Poleg tega rudarstvo pomembno vpliva k onesnaženju vode z živim srebrom, medtem ko gorenje fosilnih goriv in taljenje rud predstavljata glavni vir atmosferekega onesnaženja s Hg. Nekatere raziskave so pokazale, da morska voda, sedimenti in biota v okolici mest, pristanišč ter industrijskih con imajo običajno višje koncentracije Hg v primerjavi s podeželskimi lokacijami (Bosh in sod., 2016).

Živo srebro je v okolju prisotno v različnih oblikah. Elementarno živo srebro in njegovi ioni prevladujejo v naravi in se običajno ne akumulirajo. Čeprav se elementarna oblika direktno ne akumulira, se Hg zlahka uplini in transportira preko atmosfere na področja oceanov, kjer se pretvori v bolj topne kemijske oblike. Spojine kot so živosrebrov(II) klorid (HgCl_2), živosrebrov(I) klorid (Hg_2Cl_2) in živosrebrov sulfid (HgS), spadajo med anorganske, ne strupene in netopne oblike živega srebra. Toda kljub temu se v okolju lahko pretvorijo v organsko obliko, ki pa velja za toksično. Najpogostejša organska oblika, ki je prav tako najpogostejše najdemo v prehranjevalni verigi je metil živo srebro s splošno formulo CH_3HgX . Metil živo srebro se zlahka akumulira in nalaga v morskih organizmih. Velike plenilske ribe imajo na primer večjo verjetnost, da vsebujejo visoke koncentracije živega srebra zaradi prehranjevanja s številnimi manjšimi ribami, ki so živo srebro pridobile preko uživanja planktona (Bosh in sod., 2016; Risher, 2003).

Metiliranje nastopi ob fotokemični reakciji (fotometilacija) ali pa v procesu, ki ga katalizirajo mikroorganizmi. Bakterije sposobne redukcije sulfata, najpogostejše prisotne v sedimentu ter v škrgah ali črevesju rib, so odgovorne za večji del metilacije v naravnih vodah. Tako organske oblike živega srebra, kot so dimetil živo srebro in etil živo srebro veljata za stabilni, toksični spojini, ki se ne absorbirajo in ne akumulirajo v ribje tkivo. Toda tekom procesa metilacije se del spojine transformira in akumulira kot metil živo

srebro. Metil živo srebro ima relativno dobre lipofilne lastnosti, kar mu omogoča prehajanje preko celičnih membran. Akumulira se predvsem v mišičnem tkivu ter notranjih organih morskih organizmov ter se tako pomika navzgor po morski prehranjevalni verigi, kjer proces imenovan biomagnifikacija povzroči, da morski plenilci vsebujejo tudi do 10x več živega srebra kot ribe s katerimi se prehranjujejo. Metil živo srebro na splošno znaša od 75 do 100 % skupnega Hg prisotnega v večini vrstah rib (Bosh in sod., 2016; Olmedo in sod., 2013).

Metil živo srebro je glavna organska oblika živega srebra, katera se lahko akumulira v človeško telo preko uživanja morske hrane. Več kot 95 % akumuliranega metil živega srebra se absorbira iz prebavnega trakta in se nato preko krvnega obtoka razporedi po vseh tkivih in organih. Hitro prečka krvno-možgansko pregrado, ki ščiti možgane pred molekulami iz krvnega obtoka, in se tako prične nalagati v možganski regiji. Akumuliranje in nalaganje slednje komponente v možganih povzroči izgubo celic v malih možganih in vidnem korteksu. Drugi ciljni organi so jetra, ledvice, hipofiza, imunski in reproduktivni sistem. Zaradi sposobnosti prehajanja skozi placentno pregrado, vpliva prav tako na nevrološki razvoj zarodka (Bosh in sod., 2016). Kognitivno razmišljanje, spomin, pozornost, motorične ter vizualne prostorske sposobnosti otrok so lahko v odraščanju prizadete zaradi prenatalne izpostavljenosti metil živemu srebru (Risher, 2003). JECFA je kot dopustni tedenski vnos za metil živo srebro določila 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne teže ter za anorgansko obliko 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne teže. Najbolj ranljiva skupina so nosečnice, doječe matere in otroci, zato je pomembno paziti, da ne pride do povečane akumulacije in usodnih posledic (EFSA, 2012).

4 DOLOČANJE TEŽKIH KOVIN

Živo srebro, kadmij, arzen ter svinec so med težkimi kovinami, ki se uvrščajo med toksične in tako predstavljajo tveganje za človekovo zdravje. Naslednji odstavki pa bodo namenjeni kvalitativnemu in kvantitativnemu določanju zgoraj naštetih in predhodno opisanih težkih kovin. Pomembna je pravilna priprava vzorca in izbira detekcijske metode. Med najpogosteje uporabljene metode spadajo atomska absorpcijska spektrometrija (AAS), plamenska atomska absorpcijska spektrometrija (FAAS), induktivno sklopljena plazma (ICP), ICP masna spektrometrija (ICP-MS) ter ICP optična emisijska spektrometrija (ICP-OES).

4.1 ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA

Atomska absorpcijska spektrometrija se uporablja za kvalitativno in kvantitativno določanje kemijskih elementov. Je tehnika, pri kateri prosti atomi elementa v plinastem stanju absorbirajo elektromagnetno valovanje pri specifični valovni dolžini. AAS se lahko izvaja samo v primeru, da je analit v plinastem mediju, v katerem so posamezni atomi ali njihovi ioni ločeni med seboj. To stanje se v analiznem protokolu doseže s postopkom imenovanim atomizacija. Pretvarjanje analita v prosti atom zahteva odstranitev topila in uparitev analitov, kar zahteva toplotno energijo. Temperature atomizacije so v območju

1200-3150 °C. Različne metode AAS se ločijo ravno po načinu atomizacije, ta je lahko plamenska ali elektrotermična (Beaty in Kerber, 1993).

Merjeni fizikalni parameter je absorbanca, ki je sorazmerna s koncentracijo prostih atomov na optični poti. Atomi v nevzbujenem stanju absorbirajo svetlobo. Vir svetlobe za atomsko absorpcijo običajno predstavlja votla katodna svetilka, ki jo sestavljata volframova anoda in katoda izdelana iz analiziranega elementa. Katode so zapečateni v stekleni cevi napolnjeni z inertnim plinom (Ne ali Ar). Tako prosti prisotni atomi pri točno določeni valovni dolžini (na splošno vsaka valovna dolžina ustreza enemu elementu) absorbirajo del svetlobe. Monokromator prepušča svetlobo v ozkem območju valovnih dolžin. Izoliran žarek gre naprej v detektor, običajno s fotopomnoževalko, ki pretvori svetlobni vir v električni signal, ga ojača in na koncu izpiše kot absorbanco (Beaty in Kerber, 1993).

4.2 INDUKTIVNO SKLOPLJENA PLAZMA Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Z induktivno sklopljeno plazemsko spektrometrijo lahko določimo več elementov hkrati v zelo nizkih koncentracijah. ICP pretvarja atome elementov v ione in tako služi kot vir ionov. ICP izvor je sestavljen iz treh koncentričnih kvarčnih cevi, skozi katere teče tok inertnega plina argona. Plin se uporablja za generiranje plazme, kot izolator in kot nosilec vzorca. Prav tako v kemijsko inertni atmosferi argona poteka atomizacija (Ammann, 2007).

Za določitev težkih kovin v tunini se najpogosteje uporablja ICP s kombinacijo masne spektrometrije (ICP-MS) ter s kombinacijo optične emisijske spektrometrije (ICP-OES) imenovana tudi atomska emisijska spektrometrija (ICP-AES). Z masno spektrometrijo določamo strukturo molekul, njihovo molekulsko maso in molekulsko formulo. Tehnika je učinkovita za identifikacijo snovi na osnovi analize ionov, nastalih iz osnovne molekule ter je prav tako uporabna za majhne koncentracije (od območja ng do pg). Nastali ioni so usmerjeni v masni spektrometer, kjer se ločijo na podlagi njihovega razmerja med maso in nabojem. ICP-MS metodo zaznamuje dobra selektivnost, natančnost in točnost. Bistveni sestavni deli MS so ionski izvor, kvadrupol (pozitivne ione loči v posamezne komponente z različnimi vrednostmi razmerja masa/naboj), detektor (določi število prisotnih ionov in jih pretvori v električni tok) in procesor za obdelavo podatkov (Sheehan, 2009; Ammann, 2007).

4.3 PRIPRAVA VZORCA IN IZVEDBA ANALIZE

Določitev težkih kovin v živilih, vključno z mesom rib oz. tunine se prične z vzorčenjem. Velikokrat se v praksi srečujemo z velikimi količinami izdelka, ki ga želimo analizirati, ker pa bi analiza celotne količine izdelka pomenila veliko časovno in finančno obremenitev, si pripravimo reprezentativen vzorec. Reprezentativni vzorec predstavlja povprečno kakovost celotne količine vzorčenega izdelka oziroma živila, zato je izjemno pomembno, da je vzorčenje izpeljano v skladu s pravili. Vzorec se ustrezno shrani v čisto in suho stekleno ali plastično embalažo s tesnimi pokrovi in ustrezno označi, preden se dostavi v laboratorij za

nadaljnjo analizo (Bertoncelj, 2016a). Sledeči koraki se razlikujejo glede na analiziran vzorec ter glede na snov, ki jo v živilu oz. vzorcu želimo določiti.

Vzorec sveže ribe je po evropskem standardu EN 13804:2002 potrebno splakniti z vodo in paziti, da se med rezanjem ne poškoduje trebušna stena, zaradi možne kontaminacije tkiva. Sledi homogenizacija mišičja brez kože in kosti. Izjemo ribe, ki se uživajo celo (s kožo in kostmi), kot npr. sardine, inčuni, papaline itd. Pri določanju elementov v sledovih, ne glede ali gre za esencialne, neesencialne ali toksične elemente, sta po vzorčenju in homogenizaciji prisotna dva pomembna koraka, razklop vzorca in metoda določanja. Za razgradnjo vzorca obstajajo štiri glavne metode: (1) suhi sežig v konvencionalni pečici, (2) kislinski razklop vzorca v mikrovalovni pečici, (3) kislinska razgradnja vzorca s segrevanjem v tlačni posodi in (4) raztopitev vzorca neposredno v kislini. Najpogosteje uporabljeni metodi v laboratorijih sta suhi sežig ter mikrovalovni razkroj z močno kislino (FSAI, 2009; Rose in sod., 2001).

4.3.1 Suhi sežig

Suhi sežig pomeni, da živilo sežgemo pri visoki temperaturi ob prisotnosti kisika in tako dosežemo popolno upepelitev vzorca. Uporablja se za določanje anorganskih snovi v živilih, skupnih mineralnih snovi in surovega pepela. Pri tej metodi moramo biti pozorni na temperaturo sežiga, saj mnogi elementi hlapijo že pri nižjih temperaturah (Bertoncelj, 2016b). Pred sežigom je pomembno, da je vzorec homogeniziran, nato pripravimo ustrezen lonček za sežig. Ti so lahko iz različnih materialov, najpogosteje uporabljen porcelan (primeren za vsa živila) ter platina. Lonček je potrebno očistiti, ga na temperaturi sežiga prežariti in ohladiti v eksikatorju. Vanj dodamo določeno količino vzorca in glede na vrsto živila sežgemo na ustrezni temperaturi (med 450 °C in 1000 °C), običajno okrog 500 °C. Po končanem sežigu sledi hlajenje v eksikatorju (Hmelak Gorenjak, 2010). Dobljeni pepel raztopimo v dušikovi kislini. Po potrebi mešanico segrevamo, da se pepel dokončno raztopi. Raztopljeni ostanek prefiltriramo v merilno bučko in dopolnimo do oznake (Altundang in Tuzen, 2011).

4.3.2 Kislinski razklop v mikrovalovni pečici

Kislinski razklop v mikrovalovni pečici je naslednja najpogostejša uporabljena metoda pri določitvi elementov v sledovih in toksičnih kovin. Metoda temelji na principu mokrega sežiga, ki je omogočen zaradi dodanega močnega oksidacijskega (redukcijskega) sredstva. V primeru, da dodamo mineralne kisline, razklop poteka z oksidacijo. Od dodatku vodika ali oglja, lahko razklop izvedemo z redukcijo (Bertoncelj, 2016b). Kisline uporabljene pri metodi mikrovalovnega razklopa vzorca so: klorovodikova kislina (HCl), dušikova(V) kislina (HNO₃), vodikov peroksid (H₂O₂) ter žveplova kislina (H₂SO₄). Metoda zaradi dodatka kisline, ki omogoča razgradnjo vzorca v zaprti posodi ob uporabi mikrovalovne pečice je uporabna za določanje kovin s spektroskopskimi metodami (FSSAI, 2015).

Po končani homogenizaciji vzorca sledi dodatek kisline. V raziskavah sta velikokrat uporabljeni dve kislini hkrati, 65 % HNO₃ in 30 % H₂O₂ (Mol, 2011; Zaza in sod., 2015; Di Bella in sod., 2015; Altundang in Tuzen, 2011) ali HNO₃ in HCl v razmerju 3:1

(Akinyele in Shokunbi, 2015; Olmedo in sod., 2013). Sledi segrevanje v mikrovalovni pečici nastavljeni na temperaturo 200 °C za 10 min pri 1000 W. Razgrajen vzorec ohladimo na sobno temperaturo in kvantitativno prenesemo v merilno bučko ter dopolnimo z destilirano vodo do oznake (Di Bella in sod., 2015; Mol, 2011).

5 RAZISKAVE

Na temo vsebnosti težkih kovin v tunini so v zadnjih letih opravili kar nekaj raziskav, ki razkrivajo in predstavljajo, zakaj in kako pride od akumulacije le teh v morskih organizmih ter kako vplivajo na človekovo zdravje. V nadaljevanju sledi predstavitev nekaterih raziskav. Podane so izmerjene koncentracije in primerjave z dovoljenimi količinami. Raziskave so izvedene na različnih delih sveta, z različni metodami določanja kovin, na različnih vrstah in velikosti oz. starosti tun kar vse lahko vpliva na končen rezultat. Vsi pridobljeni rezultati predstavljenih študij ter dopustne maksimalne količine so zbrani v preglednici 1.

V raziskavi, ki so jo opravili Di Bella in sod. (2015), so analizirali elemente v sledovih pri modroplavutem tunu. Med analiziranimi elementi so bili tudi As, Cd, Hg, Pb. Dobljene rezultate so primerjali z zakonodajo o dopustnih količinah ter z tedensko dopustnimi količinami. Analizo so izvedli z metodo ICP, vzorce so zbirali od maja do avgusta 2013 na območju Sredozemskega morja. Ujetih je bilo 23 rib (od tega 13 moških in 10 žensk). V dolžino so merile od 200 do 280 cm in tehtale od 130 do 290 kg. Od vsakega vzorca je bilo odvzetega 2 do 3 kg mišičnega tkiva v predelu trebušne votline. Ob prenosu v laboratorij so bili vzorci zamrznjeni pri -20 °C do nadaljnje analize. Vzorce so homogenizirali in natehtali 0,5 g homogenizata. Nato so z metodo kislinkega razklopa v mikrovalovni pečici vzorce pripravili na ICP-MS analizo. Vzorcju so dodali 1 ml internega standarda, 8 ml HNO₃ in 2 ml H₂O₂. Razklop vzorca je potekal najprej 5 min do segretja mikrovalovne pečice na 200 °C, nato še naslednjih 5 min pri 200 °C. Sledilo je ohlajanje vzorca, ponovna natehta vzorca, kvantitativni prenos v 50 ml merilno bučko ter dopolnilo do oznake z deionizirano vodo. Iz založnih raztopin posameznega elementa so pripravili standardne raztopine različnih koncentracij. Založne raztopine so redčili z vodo visoke čistosti ter raztopine uporabili za kalibracijo inštrumenta. Dobili so naslednje rezultate: As (1,336-5,527 mg/kg), Hg (0,246- 0,714 mg/kg), Pb (0,014- 0,083 mg/kg), Cd (0,016- 0,025 mg/kg). Noben analiziran vzorec ni presegel maksimalnih dovoljenih koncentracij, ki so opredeljene z določili Evropske komisije (EC) No 1881/2006. V preglednici 1 so prikazane analizirane vrednosti in maksimalne dovoljene koncentracije v tunini opredeljene z določili Evropske komisije (EC) No 1881/2006 ter dovoljeni tedenski vnosi. Analizirani vzorci tunine predstavljajo dober vir elementov v sledovih (Fe, Zn, Se, ...). Zaužitje toksičnih elementov preučevanih v študiji ne predstavljajo visokega tveganja za zdravje povprečnega potrošnika. Kljub temu pa je treba upoštevati, da redno oz. prekomerno uživanje tunine lahko privede do prekoračitve dopustnega tedenskega vnosa.

Mol (2011) je analiziral prisotnost Pb, Hg in Cd v mesu tuna albakor iz vzhodnega dela Sredozemskega morja. Ulovljenih je bilo 43 tun povprečne dolžine 76,94 cm in teže 6,64 kg. Vzorec so pridobili tako, da so iz območja hrbtna plavuti odvzeli 50 g mišičnega tkiva. Vzorec so prenesli v laboratorij. Sledila je zatehta tkiva (0,5 g), dodatek 7 ml HNO₃ (65 %)

in 1 ml H₂O₂ (30 %). Kakor v predhodni študiji so za razklop vzorca uporabili mikrovalovno pečico pri 200 °C, toda za daljši čas tj. 10 min. Po razklopu vzorca je sledilo ohlajanje in kvantitativen prenos v 50 ml bučko. Prav tako so pripravili standardne raztopine za umeritev ICP-MS. Koncentracije kadmija v analiziranih tkivih tun albakor so se gibale od 0,011 do 0,369 mg/kg, medtem ko je povprečna vrednost znašala 0,085 mg/kg. Devet analiziranih vzorcev je preseglo postavljeno evropsko mejo, ki znaša 0,1 mg Cd/kg svežega mesa. Visoke koncentracije Cd so posledice onesnaževanja mesta Antalya, ki je priljubljeno turistično mesto (razviti ladijski, cestni in zračni promet). Koncentracije živega srebra so znašale od 0,014 do 2,01 mg/kg, koncentracije svinca pa od 0,005 do 0,075 mg/kg. Iz primerjave rezultatov in postavljenih mej določenih po Evropski komisiji (EC) No 1881/2006 je razvidno, da količine živega srebra prav tako presegajo maksimalne koncentracije dovoljenih količin v tunini. Koncentracije svinca mej niso presegle.

Pastorelli in sodelavci (2012) so opravili raziskavo, kjer so zbrali 115 vzorcev tunine kupljene v različnih prodajnih centrih v Italiji. Od tega jih je 10 predstavljalo pacifiški modroplavuti tun, ostali vzorci so bili različni morski organizmi. Vzorci so bili pripravljene po evropskem standardu EN 13804:2002 (homogenizacija ter odvzem samo užitnih delov za nadaljnjo analizo). Opravili so kislinski razklop (HNO₃ in H₂O₂) v mikrovalovni pečici (10 min, 200 °C). Enako je bilo storjeno s standardi za kalibracijo ICP-MS. Povprečne koncentracije kadmija so znašale 0,041 mg/kg, svinca 0,053 mg/kg in živega srebra 0,302 mg/kg. Tudi v tem primeru noben vzorec ni presegel dopustnih količin, ki so opredeljene z določili Evropske komisije (EC) No 1881/2006. S tem so sodelujoči odpravili bojazen pred potencialno nevarnost za človekovo zdravje ob zmernem uživanju tunine, ki naj bi vsebovala nevarne težke kovine.

Na območju aktivne vulkanske regije srednjega Atlantskega oceana so ulovili 15 velikookih tun za analizo vsebnosti Cd, Hg ter Pb (Torres in sod., 2016). Ribe so ulovili meseca maja. Odvzeto je bilo mišično tkivo, stehtano in posušeno pri 60 °C ter ponovno stehtano. Razklop vzorca je potekal po kislinskem principu v mikrovalovni pečici. Za razklop je bila uporabljena kislina t.i. zlatotopka, zmes koncentrirane HNO₃ in HCl kisline v razmerju 1 : 3. Za določitev težkih kovin so uporabili metodo AAS. Ker so maksimalne koncentracije težkih kovin, ki jih opredeljuje Evropska komisija (EC) No 1881/2006 izražene v mg/kg mokre teže, so izvajalci raziskave dobljene rezultate pretvorili iz mg/kg suhe teže v mokro težo, da bi lahko primerjali rezultate z zakonodajo. Glede na maso posamezne tune so sklepali, da je bila večina ulovljenih rib mladoletnih. Zaznanih ni bilo nobenih pomembnih razlik med analiziranim tkivom samic in samcev, zato so vsa tkiva obravnavali isto. Povprečna koncentracija Cd je znašala 0,186 µg/g, Hg 0,139 µg/g in za Pb 0,036 µg/g. Določene koncentracije Hg in Pb niso prekoračile maksimalne dovoljene količine, medtem ko so koncentracije Cd presegale maksimalno dovoljeno vrednost. Rast tun na vulkansko aktivnem območju je glavni razlog za visoke koncentracije Cd. Avtorji raziskave so poudarili tudi to, da so analizirana tkiva pripadala mladim ribam za katere velja, da imajo še hitrejšo presnovo od odraslih osebkov in tako akumulirajo večje koncentracije kovin, v tem primeru kadmija. V raziskavi je bilo prav tako možno opaziti rahlo povečanje Hg v mišičnem tkivu večjih tun. Znano je namreč, da se koncentracije akumuliranega Hg običajno večajo z velikostjo ribe. To se lahko pojasni z dejstvom, da se organska oblika živega srebra, tj. metilirano živo srebro močno povezuje s tiolno skupino v proteinih, katerih masa narašča s starostjo oz. velikostjo ribe. Poleg velikosti ribe, na

koncentracijo živega srebra vpliva sama vrsta (starost, velikost, fiziologija in presnova) ter kemijski (kakovost vode) in fizikalni (temperatura vode) dejavniki, podnebje ter usedline na bivalnem območju tun.

V zgoraj omenjenih študijah so določali koncentracijo skupnega živega srebra. Toda vemo, da anorganske oblike Hg ne predstavljajo nevarnosti za človeško zdravje, saj so netopne in se ne akumulirajo, kar ne velja za organske oblike, kot je metil živo srebro. V naslednjih dveh študijah so določili koncentracijo organskega Hg. Raziskovalci v študiji (Chen in sod., 2014) so v obdobju od leta 2001 do 2006 zbirali vzorce dveh vrst tun (Pacifiški velikooki tun in Pacifiški tun albakor). Cilj je bil določiti koncentracijo skupnega in organskega Hg v tunini ter ugotoviti korelacijo med velikostjo ribe in akumulacijo Hg v mišicah teh dveh vrst. V drugi študiji (Chen in sod., 2011) so prav tako določali skupen in organski Hg, toda samo v vzorcih velikookega tuna ulovljenega v Atlantskem (121 vzorcev) in Indijskem oceanu (110 vzorcev) med letoma 2005 in 2007. V obeh primerih je postopek določanja potekal enako. Vzorce so odvzeli iz hrbtni strani rib ter jih do analiz shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato so natehtali 0,2 - 0,4 g mokrega vzorca, h kateremu so dodali aceton za odstranitev lipidov, ki pokrivajo površino mišice. Sledi 3-kratna ekstrakcija organskega Hg, prvič z dodatkom kalijevega bromida in bakrovega sulfata, drugič s toluenom in tretjič z raztopino natrijevega persulfata. Po končani ekstrakciji organskega Hg, sledi razklop vzorca in določitev skupnega Hg, ki pa poteka po enakem postopku kakor v predhodnih raziskavah, to je s kislinim razklopom.

Rezultati so bili sledeči: v raziskavi, ki so jo Chen in sodelavci opravili leta 2014, je bila povprečna kontaminacija s Hg manjša v vzorcih tun albakor kakor v vzorcih velikookega tuna, zaradi manjše povprečne velikosti tuna albakor. Med seboj so primerjali rezultate skupnega in organskega Hg obeh vrst pridobljene iz enako velikih rib in ugotovili, da v tem primeru vrsta tune ni vplivala na koncentracijo akumuliranega Hg. Prav tako so potrdili postavljeno hipotezo, da obstaja povezava med velikostjo ribe in stopnjo akumulacije. Večja velikost pomeni višjo koncentracijo Hg. V 13 vzorcih velikooke tuna so analizirali povišano koncentracijo skupnega Hg, ki presega varne meje, to je $1\text{ }\mu\text{g/g}$ mokre teže, medtem ko v ostalih vzorcih meje niso bile prekoračene. Povprečna izmerjena koncentracija organskega Hg pri tunu albakor je $0,283\text{ }\mu\text{g/g}$ in $0,631\text{ }\mu\text{g/g}$ pri velikookem tunu (Chen in sod., 2014).

V raziskavi, ki so jo Chen in sodelavci opravili leta 2011, je vsebnost skupnega Hg pri velikookem tunu prav tako presegla dopustne maksimalne količine. Tukaj so se vrednosti za skupni Hg gibale od $0,217 - 1,880\text{ mg/kg}$ v Indijskem oceanu, v Atlantskem pa $0,217 - 3,133\text{ mg/kg}$. Vrednosti za organski Hg so v tunah iz Indijskega oceana znašale $0,143 - 1,525\text{ mg/kg}$, v Atlantskem pa $0,143 - 2,222\text{ mg/kg}$. Razvidno je, da so tune ulovljene v Atlantskem oceanu imele višje koncentracije akumuliranega živega srebra (Chen in sod., 2011). Take razlike med oceanoma so lahko posledice razlik v prehrani in velikosti rib ter vsesplošne emisije živega srebra.

Preglednica 1: Maksimalne koncentracije dovoljenih količin za Pb, Cd, As ter skupni in organski Hg v tunini (mg na kg tunine), koncentracije dopustnega tedenskega vnosa (TWI; mg na kg telesne teže) (Commission Regulation (EC) No 1881/2006) ter koncentracije Hg, Pb, Cd in As v tunini (podane v mg na kg tune) določene v raziskavah (DiBella in sod., 2015; Mol, 2011; Pastorelli in sod., 2012; Torres in sod., 2016).

	Maks konc. (mg/kg)	TWI* (mg/kg)	Koncentracije določene v raziskavah (mg/kg):			
			DiBella in sod., 2015	Mol in sod., 2011	Pastroelli in sod., 2012	Torres in sod., 2016
Skupni Hg	1	0,004	0,246- 0,714	0,014- 2,01	0,302	0,139
Organski Hg		0,0013				
Pb	0,3	0,025	0,014- 0,083	0,005- 0,075	0,053	0,036
Cd	0,1	0,025	0,016- 0,025	0,011- 0,369	0,041	0,186
As			1,336- 5,527	-	-	-

*TWI= dopustni tedenski vnos

6 ZAKLJUČEK

Tuna ali latinsko *Thunnus* je morski organizem, ki ga lahko najdemo skoraj v vseh oceanih in morjih na Zemlji ter je prepoznaven po izjemni hitrosti, ki jo lahko doseže med lovom. Visoka hitrost jih tako dela dobre plenilce in uvršča visoko v hierarhiji prehranjevalne verige. Tune so sposobne ob nenadnem potopu v globine ohraniti svojo telesno temperaturo. Raziskave namreč dokazujejo, da tune s pomočjo sproščenega adrenalina ob stresu, ki vpliva na mišično kontrakcijo, vzdržujejo srčni utrip ob nenadni spremembi okoliške temperature. Tako tune s svojim edinstvenim metabolizmom spadajo med endotermne živali (Shiels in sod., 2014). V številnih člankih so raziskovalci poročali, da plenilske ribe, ki zasedajo visoke položaje v morskih ekosistemih vsebujejo višjo vsebnost težkih kovin. V primeru tun so to arzen, kadmij, svinec ter najbolj izstopajoča kovina - živo srebro (Chen in sod., 2014). Naštete kovine se zlahka akumulirajo v mišičje plenilskih rib in tako lahko ob prevelikem vnosu rib predstavljajo nevarnost za človekovo zdravje.

Izvedene so bile študije vsebnosti težkih kovin v tunini. V raziskavah so težke kovine v vzorcih tunine določali z dve metodama: atomsko absorpcijsko spektrometrijo in z induktivno sklopljeno plazmo z masnim detektorjem. Dobljeni rezultati so se med seboj razlikovali glede na geografsko območje ulova, glede na uporabljeno detekcijsko metodo ter glede na različne vrste in velikosti (starosti) tun.

Kot je razvidno, v mesu rib ni bilo zaznanih koncentracij, ki bi prekoračile postavljene dopustne maksimalne količine posameznih težkih kovin. Samo v določenih primerih so bile zaznane prekoračene dopustne koncentracije težkih kovin v tunini, in sicer v raziskavi (Mol, 2011), kjer so visoke koncentracije posledice onesnaževanja ribolovnega območja ter v raziskavi (Torres in sod., 2016) kje so vzorce pridobili iz tun ulovljenih na območju aktivne vulkanske regije. Iz raziskave (Torres in sod., 2016) je bilo mogoče potrditi korelacijo med velikostjo tune in koncentracijo akumuliranih težkih kovin. Z rastjo tune zasedajo vse višje položaje v morskem ekosistemu. Skozi leta in leta se težke kovine akumulirajo in nalagajo v tkiva plenilcev preko prehranske verige, kar pomeni, da se z leti prav tako višajo koncentracije absorbiranih težkih kovin.

Ob uživanju tunine je, kljub njihovi pomembni vlogi v prehrani človeka potrebna določena previdnost zaradi vsebnosti težkih kovin. Tunina sicer velja za zdravo in kakovostno hrano, saj vsebuje omega-3 nenasičene maščobne kisline, ki imajo ugodne učinke na zdravje. Iz podanih raziskav je razvidno, da tune vsebujejo težke kovine, vendar so analizirane količine pod postavljeno mejo. Vseeno pa velja, da so ob pretiranem vnosu tunine posledice lahko negativne. Zato je pomembno, da se tunino uživa v zmernih količinah in s tem zmanjša možnost za prekoračitev dopustnih tedenskih vnosov težkih kovin.

7 VIRI

- Akinyele I.O., Shokunbi O.S. 2015. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chemistry*, 173: 682-684
- Altundang H., Tuzen M. 2011. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2800-2807
- Ammann A. A. 2007. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 419-427
- Beatty R. D., Kerber J. D. 1993. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry. 2nd ed. Norwalk, The Perkin-Elmer Corporation: 96 str.
- Bertoncelj J. 2016a. Vaje pri predmetu kakovost živil in zakonodaja: vzorčenje in priprava vzorca. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 2 str. (interno gradivo)
- Bertoncelj J. 2016b. Vaje pri predmetu kakovost živil in zakonodaja: suhi in mokri sežig, določanje vsebnosti pepela, alkalnosti pepela in kislosti. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11 str. (interno gradivo)
- Blaznik U. 2011. Vnos kovin v človeško telo s hrano. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija republike Slovenije za okolje, Inštitut za varovanje zdravja RS: 6 str. http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=377 (december 2017)
- Bosh C. A., O'Neill B., Sigge O. G., Kerwath E. S., Hoffman C. L. 2016. Heavy metals in marine fish meat and consumers health: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1: 32-48
- Chen C.Y., Lai C.C., Chen K.S., Hsu C.C., Hung C.C., Chen M.H. 2014. Total and organic mercury concentrations in the muscles of Pacific albacore (*Thunnus alalunga*) and bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Marine Pollution Bulletin*, 85: 606-612
- Chen M.H., Teng P.Y., Chen C.Y., Hsu C.C. 2011. Organic and total mercury levels in bigeye tuna, *Thunnus obesus*, harvested by Taiwanese fishing vessels in the Atlantic and Indian Oceans. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 4, 1: 15-21
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2006. *Official Journal of the European Union*, 49, L364: 5-24
- Csirke J. 2005. Global production and state of marine fishery resources. V: Review of the state of world marine fishery resources. FAO Fisheries technical paper 457. Rome, Food and Agriculture Organization: 1-9

- Di Bella G., Potorti A.G., Lo Turco V., Bua D., Licata P., Cicero N., Dugo G. 2015. Trace elements in *Thunnus thynnus* from Mediterranean Sea and benefit- risk assessment for consumers. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8, 3: 175-181
- EC. 2017. Arsenic in food. Brussels, European Commission: 3 str.
https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/catalogue/arsenic_en (december 2017)
- EC. 2018. Bluefin tuna (*Thunnus Thynnus*). Brussels, European Commission: 1 str.
https://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/wild_species/bluefin_tuna_en (februar, 2018)
- EFSA. 2009. Scientific opinion of arsenic in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, 7, 10: 1351, doi: 10.2903/j.efsa.2009.1351: 199 str.
- EFSA. 2010. Scientific opinion of lead in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, 8, 4: 1570, doi: 10.2903/j.efsa.2010.1570: 151 str.
- EFSA. 2012. Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, 10, 12: 2985, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2985: 241 str.
- FAO. 2011. Review of the state of world marine fishery resources. Fisheries and aquaculture technical paper 569. Rome, Food and Agricultural Organization: 334 str.
- FSAI. 2009. Mercury, lead, cadmium, tin and arsenic in food. Toxicology Factsheet Series: Food Safety Authority of Ireland, 1: 1-13
- FSSAI. 2015. Manual of methods of analysis of foods (metals). New Delhi, Food Safety and Standards Authority of India, Ministry of Health and Family Welfare: 76 str.
- Gardieff S. 2005. Bluefin tuna. Gainesville, Florida Museum of Natural History: 7 str.
<https://www.floridamuseum.ufl.edu/fish/discover/species-profiles/thunnus-thynnus> (september 2017)
- Graham J.B., Dickson K.A. 2004. Tuna comparative physiology. *Journal of Experimental Biology*, 207: 4015- 4024
- Hassan H.A., Zeinhom M.A., Abedl W.A., Tolba M.H. 2016. Heavy metal dietary intake and potential health risks for University hostel students. *Biological Trace Element Research*, 170: 65-74
- Hmelak Gorenjak A. 2010. Živilska kemija z analizo živil in analiza živil. Učbenik za višješolski strokovni program Živilstvo in prehrana. Ljubljana, Zavod IRC: 81-83
- Hwang M. 2005. »*Thunnus alalunga*«. V: Animal diversity web (On-line). Michigan, University of Michigan: 8 str.
http://animaldiversity.org/accounts/Thunnus_alalunga/ (september 2017)
- ISSF. 2017. Status of the world fisheries for tuna: technical report 2017-02. Washington, International Seafood Sustainability Foundation: 99 str.

<https://iss-foundation.org/download-monitor-demo/download-info/issf-2017-02-status-of-the-world-fisheries-for-tuna-feb-2017/> (oktober 2017)

- Johnson M. 2006. »*Thunnus thynnus*«. V: Animal diversity web (On-line). Michigan, University of Michigan: 10 str.
http://animaldiversity.org/accounts/Thunnus_thynnus/ (september 2017)
- Mol S. 2011. Levels of selected trace metals in canned tuna fish produced in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 66-69
- Olmedo P., Hernandez A.F., Pla A., Femia P., Navas-Acien A., Gil F. 2013. Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury- selenium balance. *Food and Chemical Toxicology*, 62: 299-307
- Pastorelli A.A., Baldini M., Stacchini P., Baldini G., Morelli S., Sagratella E., Zaza S., Ciardullo S. 2012. Human exposure to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption in Italy: a pilot evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29, 12: 1913-1921
- Risher J.F. 2003. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: Human health aspects. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety: 68 str.
<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf?ua=1> (november 2017)
- Rose M., Knaggs M., Owen L., Baxter M. 2001. A review of analytical methods for lead, cadmium, mercury, arsenic and tin determination used in proficiency testing. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16: 1101-1106
- Sheehan D., 2009. Principles of mass spectrometry. V: Physical biochemistry: principles and applications. 2nd ed. Cork, Wiley-Blackwell Publishing: 113-122
- Shiels H. A., Galli G. L. J., Block B. A. 2014. Cardiac function in an endothermic fish: cellular mechanisms for overcoming acute thermal challenges during diving. *Proceedings of the Royal Society B*, 282: 10 str.
- Swanson D., Block R., Mousa S.A. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Advances in Nutrition*, 3: 1-7
- Torres P., Rodrigues A., Soares L., Garcia P. 2016. Metal concentrations in two commercial tuna species from an active volcanic region in the Mid-Atlantic Ocean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 341-347
- Zaza S., Balogh K., Palmery M., Pastorelli A.A., Stacchini P. 2015. Human exposure in Italy to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption from Eastern Central Atlantic Fishing Area. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40: 148-153
- ZZRS. 2009. Gradivo za strokovni izpit za ribogojca. Spodnje Gameljne, Zavod za ribištvo Slovenije: 125 str.

https://www.zzrs.si/uploads/Strokovni_izpit_za_ribogojca_17102016.pdf4 (oktober 2017)