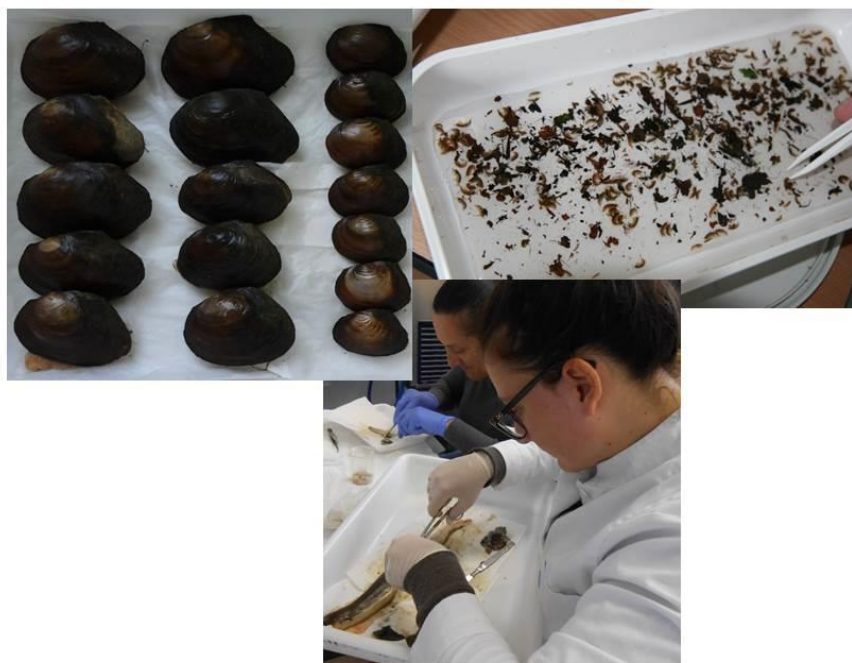


METODOLOGIJA PROVOĐENJA MONITORINGA PRIORITETNIH TVARI U BIOTI POVRŠINSKIH KOPNENIH VODA



Zagreb, rujan 2018.

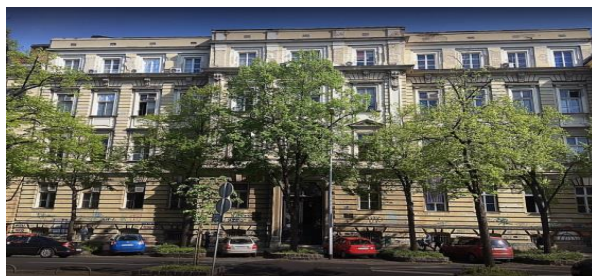
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ

**Bijenička cesta 56
10000 Zagreb
Hrvatska**



**BIOLOŠKI ODSJEK
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**Rooseveltov trg 6
10000 Zagreb
Hrvatska**



METODOLOGIJA PROVOĐENJA MONITORINGA PRIORITETNIH TVARI U BIOTI POVRŠINSKIH KOPNENIH VODA

Voditelj studije:

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

**Za konzorcij:
Ravnatelj
Institut Ruđer Bošković**

Dr. sc. David Matthew Smith

Zagreb, rujan 2018.

Metodologiju izradili:

Dr. sc. Nevenka Mikac

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Dr. sc. Perica Mustafić

Dr. sc. Jasna Lajtner

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

SADRŽAJ

POJMOVNIK STRUČNIH IZRAZA I KRATICA	1
1. UVOD	2
2. CILJEVI DONOŠENJA SKVO ZA BIOTU I NAČIN DEFINIRANJA SKVO _{biota}	2
3. PREPORUKE ZA PROVOĐENJA MONITORINGA BIOTE U OKVIRU EUROPSKE DIREKTIVE O VODAMA	5
3.1. Osmišljavanje programa uzorkovanja	5
3.2. Odabir vrste monitoringa (pasivni ili aktivni biomonitoring)	6
3.2.1. Preporuke za provođenje pasivnog biomonitoringa	8
3.3. Obrada i prikaz rezultata	9
3.3.1. Normalizacija na sadržaj masti i suhe tvari	9
3.3.2. Utjecaj trofičkog nivoa na ocjenu sukladnosti sa SKVO _{biota}	10
3.3.3. Opis primjene pasivnih uzorkivača kao alternativa monitoringu prioriternih tvari u bioti	11
4. PROBLEM USKLAĐIVANJA REZULTATA MONITORINGA BIOTE SA SKVO _{biota} ZA NEKE PRIORITETNE TVARI	12
5. IZBOR VRSTA RIBA ZA ODREĐIVANJE PRIORITETNIH TVARI U POVRŠINSKIM KOPNENIMA VODAMA	13
5.1. Ugroženost i zaštita odabranih vrsta riba	15
5.2. Ekologija odabranih vrsta riba	16
5.3. Trofički nivo odabranih vrsta riba	19
6. Izbor beskralježnjaka za određivanje prioriternih tvari u površinskim kopnenim vodama	19
6.1. Problemi pri uzorkovanju beskralježnjaka u nekim površinskim kopnenim vodama u okviru preliminarnog monitoringa tijekom 2017. godine	20
7. ZAKLJUČAK	21
8. LITERATURA	22
9. PRILOZI	25
9.1. Napatuk za uzorkovanje i pripremu uzoraka riba za provođenje monitoringa u površinskim kopnenim vodama	25
9.1.1. Vrsta riba, preporučena dužina i starost te period uzorkovanja	25
9.1.2. Način uzorkovanja riba	27
9.1.3. Obrada i priprema uzoraka riba za analizu	27
9.2. Napatuk za uzorkovanje i pripremu uzoraka školjkaša za provođenje monitoringa biote u površinskim kopnenim vodama	29
9.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka školjkaša	30
9.2.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka rakušaca	30

POJMOVNIK STRUČNIH IZRAZA I KRATICA

Aktivni biomonitoring – izlaganje uzgajanih organizama tijekom određenog perioda na lokaciji od interesa

BaP = benzo(a)piren

CF = kondicijski faktor (engl. condition factor)

Flu = fluoranten

HBCDD – heksabromociklododekan

HCB – heksaklorbenzen

HCBD - heksaklorbutadien

Hg – živa

LDPE - polietilen niske gustoće (engl. low density polyethylene)

ODV – okvirna direktiva o vodama

PAH – poliaromatki ugljikovodici

Pasivni biomonitoring – uzorkovanje nativnih organizama

PBDE – polibromirani difenileteri

PDMS – polidimetilsiloksan

PFOS – perfluorooktansulfonska kiselina

SKVO_{biota,sek.trov} – standard kakvoće za biotu kad je cilj zaštita organizama na vrhu trofičkog lanca od sekundarnog trovanja

SKVO_{biota,ljud.zdrav} – standard kakvoće za biotu kad je cilj zaštita ljudskog zdravlja

SKVO – standard kakvoće vodnog okoliša

SKVO_{biota} – standard kakvoće okoliša za biotu

SPMD - polupropusne membrane (engl. semipermeable membrane device)

TBT - tributil kositar (engl. - tributyltin)

TE – toksični ekvivalent

TL – trofički nivo (engl. trophical level)

TMF - faktor trofičkog obogaćenja (engl. trophic magnification factor)

$\delta^{15}\text{N}$ – omjer stabilnih izotopa dušika

1. UVOD

U Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/13, 151/14, 78/15 i 61/16) propisani su standardi kakvoće vodnog okoliša (SKVO) za određene pokazatelje u bioti i ocjena kemijskog stanja voda s obzirom na njih, a u skladu s Okvirnom direktivom o vodama Europske unije 2000/60/EZ (EC 2000), Direktivom 2008/105/EZ o standardima kakvoće okoliša (EC 2008) i Direktivom 2013/39/EU (EU 2013) o izmjeni direktiva 2000/60/EZ i 2008/105/EZ u odnosu na prioritetne tvari u području vodne politike. U Direktivi iz 2008. su bili propisani SKVO za biotu, kao i za vodu, za živu, heksaklorbenzen i heksaklorbutadien, a u Direktivi iz 2013. godine uvedeni su SKVO za biotu za fluoranten, poliaromatske ugljikovodike i bromirane difeniletere s liste prioritetnih tvari iz 2008. godine te za sljedeće nove prioritetne tvari – dikofol, perfluorooktan sulfonsku kiselinu i njezine derivate, dioksine i spojeve poput dioksina, heksabromociklododekan te heptaklor i heptaklorepoksid. Propisani SKVO se odnose na ribu, osim u slučaju poliaromatskih ugljikovodika i fluorantena, čiji standardi se odnose na rakove i mekušce.

Postojanje hrvatske regulative o ocjeni kemijskog stanja voda na osnovu mjerenja koncentracija prioritetnih tvari u bioti omogućava korištenje biote u monitoringu vodnih tijela i ocjeni njihovog kemijskog stanja. U svrhu razvoja usklađene strategije monitoringa voda u okviru Okvirne direktive o vodama (2000/60/EC), 2014. godine objavljen je Dokument Europske komisije br. 32 „O monitoringu biote (primjena SKVO za biotu) u okviru Europske direktive o vodama“ (EC 2014a), u kome se navode preporuke za provođenje monitoringa biote u državama članicama Evropske unije pa prema tome služi kao baza za donošenje metodologije provođenja monitoringa biote u Hrvatskoj. Preporuke za provođenje metodologije uzorkovanja i analiza te provedbe preliminarnog monitoringa prioritetnih tvari u bioti propisuju se ovom Metodologijom sukladno Dokumentu Europske komisije br. 32 „O monitoringu biote (primjena SKVO za biotu) u okviru Europske direktive o vodama“ te postojećim hrvatskim dokumentima o provođenju monitoringa u Okvirnoj direktivi o vodama te dostupnim vodenim organizmima u već definiranim vodnim tijelima u Hrvatskoj u kojima se sustavno istraživanje površinskih voda provodi od 2012. godine.

2. CILJEVI DONOŠENJA SKVO ZA BIOTU I NAČIN DEFINIRANJA SKVO_{biota}

Standardi kakvoće igraju važnu ulogu u gospodarenju vodama, prije svega u ocjeni stanja i klasificiranju vodnih tijela te identificiranju rizika od onečišćenja kao i za provedbu mjera za smanjenje onečišćenja odnosno kontrolu emisija. Usklađenost sa standardima kakvoće podrazumijeva zaštitu vodenih ekosustava od mogućeg negativnog učinka kemikalija, kao i zaštitu ljudskog zdravlja od negativnog učinka vode za piće ili hrane koja potječe iz vodenih ekosustava. Prema tome, standardi kvalitete okoliša za biotu doneseni su s ciljem zaštite slatkovodnih i morskih sustava od neželjenih učinaka koje štetne tvari mogu imati na vodene organizme i čovjeka putem prehrane vodenim organizmima.

U definiranju SKVO za biotu nekoliko ciljeva zaštite uzeto je u obzir:

- 1) zaštita pelagičkih i bentičkih zajednica u površinskim kopnenim vodama, zaštita predatora u navedenim ekosustavima te zaštita ljudskog zdravlja od štetnog učinka konzumacijom hrane (posebno vodenih organizama poput riba, mekušaca, rakova, ribljih ulja i sl.) onečišćene različitim kemikalijama. Standard se označava sa $SKVO_{\text{biota, ljud. zdrav.}}$.
- 2) zaštita od akumulacije kemijskih tvari u hranidbenom lancu, što se osobito odnosi na organizme na vrhu hranidbenog lanca poput ptica i sisavaca, kod kojih postoji rizik od sekundarnog trovanja putem konzumacije plijena zagađenog opasnim tvarima. Standard se označava sa $SKVO_{\text{biota, sek. trov.}}$.

Tvari koje treba ispitivati u bioti propisane su Uredbom o standardu kakvoće voda (NN 73/13, 151/14, 78/15 i 61/16) te su trenutno u Europi i Hrvatskoj SKVO za biotu definirani za 11 prioriternih tvari koje su navedene u Tablici 2.1., a utvrđene su na osnovu ekotoksikoloških testova o toksičnim učincima navedenih tvari na istraživane organizme, uzimajući u obzir i odgovarajući faktor procjene rizika.

Tablica 2.1. Popis prioriternih tvari za koje su definirani SKVO za biotu.

Broj	Naziv prioriternne tvari	CAS broj	EU broj	Utvrđena kao prioriterna opasna tvar	Standard kakvoće za biotu ($SKVO_{\text{biota}}$) ($\mu\text{g/kg m.t.}$)
(5)	Polibromirani difenileteri	32534-91-9		x	0,0085
(15)	Fluoranten	206-44-0	205-912-4		30
(16)	Heksaklorbenzen	118-74-1	204-273-9	x	10
(17)	Heksaklorobutadien	87-68-3	201-765-5	x	55
(21)	Živa i njezini spojevi	7439-97-6	231-106-7	x	20
(28)	Benzo(a)piren	50-32-8	200-028-5	x	5
(34)	Dikofol	115-32-3	204-082-0	x	33
(35)	Perfluoroktansulfonska kiselina (PFOS)	1763-23-1	217-179-8	x	9,1
(37)	Dioksini i spojevi poput dioksina	-	-	x	0,0065 (zbroj TE)
(43)	Heksabromociklododekan (HBCDD)	25637-99-43194-55-6	-	x	167
(44)	Heptaklor i heptaklorepoksid	76-44-8 /1024-57-3	200-962-3 /213-831-0	x	0,0067

TE- toksični ekvivalenti prema čimbenicima toksične ekvivalencije

S obzirom da su standardi propisani za vodu u vrlo niskom koncentracijskom području za pojedine prioriternne tvari i dostupnim analitičkim tehnikama teško ih je određivati u vodi, pa su iz tog razloga i propisani standardi i za biotu.

Izbor vrste organizama u kojima će se provesti analiza prioriternih tvari ovisi o potencijalu pojedinih prioriternih tvari za biomagnifikaciju u prehrambenom lancu. S obzirom da je većina prioriternih tvari podložna biomagnifikaciji definirano je da se one analiziraju u ribama koje su na višem trofičkom nivou. Izuzetak su PAH-ovi (poliaromatski ugljikovodici), kao što su fluoranten i benzo(a)piren, koji se jače akumuliraju u beskralježnjacima, zbog činjenice da se ti spojevi metaboliziraju u ribama. Zbog toga je predviđeno da se analize PAH-ova rade u organizmima na nižem trofičkom nivou te je definirano da se oni analiziraju u rakovima ili školjkašima (Tablica 2.2). Analiza u ribama predviđena je u dvije različite vrste tkiva, ovisno radi li se o zaštiti od sekundarnog trovanja ili zaštiti ljudskog zdravlja pa je za zaštitu predatora koji konzumiraju cijelu ribu potrebna analiza cijele ribe, a za zaštitu zdravlja čovjeka (kad se konzumira očišćena riba) je potrebna analiza mišićnog tkiva ribe. U Tablici 2.2. je za svaku prioritetnu tvar za koju je definiran SKVO_{biota} naveden cilj zaštite, vrsta organizma definirana za analizu, kao i tip tkiva koji treba analizirati kod riba.

Tablica 2.2. Vrsta organizama, cilj zaštite i vrsta ribljeg tkiva za analizu za svaku pojedinu prioritetnu tvar za koju je definirana vrijednost SKVO_{biota}

Broj	Naziv prioriternne tvari	Vrsta organizma	Cilj zaštite	Tkivo za analizu
(5)	Polibromirani difenileteri	Ribe	Ljudsko zdravlje	Mišić ribe
(15)	Fluoranten	Rakovi i školjkaši	Ljudsko zdravlje	Ukupno meko tkivo
(16)	Heksaklorbenzen	Ribe	Ljudsko zdravlje	Mišić ribe
(17)	Heksaklorobutadien	Ribe	Sekundarno trovanje	Cijela riba
(21)	Živa i njezini spojevi	Ribe	Sekundarno trovanje	Cijela riba
(28)	Benzo(a)piren	Rakovi i školjkaši	Ljudsko zdravlje	Ukupno meko tkivo
(34)	Dikofol	Ribe	Sekundarno trovanje	Cijela riba
(35)	Perfluoroktansulfonska kiselina (PFOS)	Ribe	Ljudsko zdravlje	Mišić ribe
(37)	Dioksini i spojevi poput dioksina	Ribe, rakovi i školjkaši	Ljudsko zdravlje	Mišić ribe ili ukupno meko tkivo
(43)	Heksabromociklododekan (HBCDD)	Ribe	Sekundarno trovanje	Cijela riba
(44)	Heptaklor i heptaklorepoxid	Ribe	Ljudsko zdravlje	Mišić ribe

Važno je naglasiti kako većina prioriternih tvari nije raspodijeljena jednoliko u tkivima riba, nego se, ovisno o njihovim kemijskim svojstvima, više akumuliraju u masnim tkivima (hidrofobni organski spojevi) ili u mišićnom tkivu i utrobnim organima (metali). Prema tome, u riba se ovisno o cilju zaštite (ljudsko zdravlje ili sekundarno trovanje) razlikuju vrijednosti standarda kakvoće, na temelju činjenice da se u jednom slučaju odnose na analizu cijele ribe, a u drugom na analizu mišićnog tkiva kao što je prikazano u Tablici 2.3.

Tablica 2.3. Standardi kakvoće (SKVO_{biota}) za dva različita cilja zaštite, ljudsko zdravlje ili sekundarno trovanje.

Broj	Naziv prioritetne tvari	SKVO _{biota,ljud.zdrav.} µg/kg m.t.	SKVO _{biota,sek.trov.} µg/kg m.t.
(5)	Polibromirani difenileteri (PBDE)	0,0085	44
(15)	Fluoranten (Flu)	30	11522
(16)	Heksaklorbenzen (HCB)	10	16,7
(17)	Heksaklorobutadien (HCBd)	12,2	55
(21)	Živa i njezini spojevi (Hg)	500	20
(28)	Benzo(a)piren (BaP)	5	Nema podataka
(34)	Dikofol	134	33
(35)	Perfluoroktansulfonska kiselina (PFOS)	9,1	33
(37)	Dioksini i spojevi poput dioksina	0,0065 (zbroj TE)	0,0012 (zbroj TE)
(43)	Heksabromociklododekan (HBCDD)	6100	167
(44)	Heptaklor i heptaklorepoksid	0,0067	33

Zbog izrazito velikih razlika u SKVO_{biota} za dva različita cilja zaštite, posebice za PBDE, fluoranten i heptaklor/heptaklorepoksid, korištenjem samo jedne vrste tkiva za analizu svih prioritetnih tvari (što bi bilo praktično s aspekta provođenja monitoringa) onemogućava se relevantna ocjena kemijskog stanja putem korištenja SKVO_{biota} za ciljeve kako su definirani u regulativi. Ako bi se analizirao samo mišić riba generalno bi se podcijenio rizik za predatore kao i za ljude koji konzumiraju cijelu ribu, a kod analize cijele ribe dolazilo bi do precjenjivanja rizika za ljudsko zdravlje za većinu spojeva (naročito za PBDE, HCB, PFOS, dioksine i heptaklor/heptaklorepoksid), s izuzetkom žive i njezinih spojeva čije su koncentracije više u mišiću. Moguće je odrediti konverzijski faktor između koncentracije spojeva u cijeloj ribi i one u mišiću, ali s obzirom na veći broj vrsta koji se obično u monitoringu koristi, određivanje takvog faktora tražilo bi zahtjevna dodatna istraživanja. Također je moguće koristiti normalizaciju na sadržaj lipida, ali taj pristup je također zahtjevan i može rezultirati velikim greškama ako normalizacija nije ispravno provedena. Zbog svega navedenog predlažemo da se ocjena kemijskog stanja putem biomonitoringa provodi na način da se za prioritetne tvari za koje je cilj zaštita od sekundarnog trovanja analizira cijela riba, a za one za koje je cilj zaštita ljudskog zdravlja analizira mišićno tkivo.

3. PREPORUKE ZA PROVOĐENJA MONITORINGA BIOTE U OKVIRU EUROPSKE DIREKTIVE O VODAMA

3.1. Osmišljavanje programa uzorkovanja

Sustavno istraživanje ekološkog i kemijskog stanja slatkovodnih ekosustava u Republici Hrvatskoj, prema zahtjevima Okvirne direktive o vodama (ODV) 2000/60/EC (EC, 2000) koji su preneseni u hrvatsko zakonodavstvo, organizira se na način da se može ocijeniti

ekološko i kemijsko stanje unutar razmatranog vodnog tijela. Uzorkovanje biote može se provoditi unutar nadzornog, operativnog ili istraživačkog monitoringa, međutim najčešće se provodi unutar nadzornog monitoringa. U Dokumentu br. 32 (EC, 2014a) preporučeno je da se za usklađivanje sa SKVO_{biota} uzorkovanje provodi najmanje jednom godišnje, osim ako se stručno ne donese prijedlog neke druge frekvencije uzorkovanja. Isti dokument za monitoring vremenskih trendova preporuča uzorkovanje biote najmanje jednom u tri godine. Iz praktičnih razloga trebalo bi razmotriti mogućnost kombiniranja uzorkovanje biote za kemijski monitoring sa uzorkovanjem biote za ekološki monitoring, čime se osigurava smanjenje troškova, kao i kompletna biološka karakterizacija biote koja se koristi u kemijskom monitoringu. Potreban broj uzoraka biote koji bi omogućio pouzdanu ocjenu dobivenih rezultata s obzirom na definirane SKVO za biotu ovisi o očekivanoj (mjerenoj) varijabilnosti koncentracije između uzoraka i zadanom nivou pouzdanosti kod procjene da li izmjerena koncentracija prelazi zadani SKVO_{biota}. Varijabilnost koncentracija na pojedinoj lokaciji trebala bi se utvrditi analizom većeg broja individualnih uzoraka biote za što bi bio potreban dodatni istraživački monitoring. S obzirom da su sredstva za takve svrhe obično ograničena, smatra se da kombinirani uzorci biote koji sadrže više individualnih uzoraka daju dovoljno dobru procjenu srednje koncentracije pojedine prioritetne tvari u bioti na određenoj lokaciji, premda je tim pristupom izgubljen podatak o varijabilnosti koncentracija.

U preporukama navedenim u Dokumentu br. 32 (EC, 2014a) spominje se i mogućnost procjene stupnja zagađenja područja u kojem treba provoditi monitoring na osnovu prethodnih mjerenja provedenih u vodi ili sedimentu te uvođenja monitoringa biote samo u vodnim tijelima gdje je zagađenje utvrđeno. Međutim, kako su koncentracije tvari u vodi podložne velikim varijacijama, a za većinu prioritetnih tvari nema pouzdanih podataka o bioakumulacijskim faktorima, iz koncentracija u vodi nije moguće pouzdano procijeniti akumulaciju u žive organizme. Također se spominje moguće korištenje pasivnih uzorkivača (koji se mogu koristiti i za vodu i za sediment) za procjenu udjela tvari koji je biodostupan. Korištenje pasivnih uzorkivača omogućava procjenu bioakumulacije hidrofobnih organskih tvari samo u organizme na najnižem stupnju trofičkog lanca.

3.2. Odabir vrste monitoringa (pasivni ili aktivni biomonitoring)

Prilikom monitoringa biote mogu se koristiti dva pristupa, pasivni monitoring (uzorkovanje nativnih organizama) i aktivni monitoring (korištenje uzgajanih organizama koji se izlažu na postajama gdje nije moguće uzorkovati nativne organizme). Svaki od dva pristupa biomonitoringu ima prednosti i ograničenja, kao što je ukratko navedeno u Tablici 3.2.1.

Tablica 3.2.1. Prednosti i ograničenja pasivnog i aktivnog biomonitoringa.

	Pasivni biomonitoring (korištenje nativnih organizama)	Aktivni biomonitoring (korištenje uzgajanih organizama)
Prednosti	<ul style="list-style-type: none"> • Jednostavno provođenje uzorkovanja • Moguća ocjena dugoročnog zagađenja • Najčešće korišten, postoji metodologija • Relevantan za lokalnu ekologiju 	<ul style="list-style-type: none"> • Ograničen broj vrsta organizama • Moguć izbor mjesta i vremena uzorkovanja • Poznato vrijeme izloženosti zagađenju • Moguća kontrola biotičkih parametara (ista veličina, spol, starost) • Moguć izbor vrste i podrijetla organizma • Moguća ponovljivost • Predvidljivost troškova i trajanja uzorkovanja
Ograničenja	<ul style="list-style-type: none"> • Ovisi o geografskoj rasprostranjenosti vrste • Pokretljivost i migracije vrsta • Broj i vrsta jedinki može varirati među lokacijama • Nepoznato vrijeme izloženosti zagađenju • Razlike u bioakumulaciji spojeva ovisе o vrsti • Biotički faktori (spol, starost, veličina) utječu na rezultat • Mogući utjecaj na lokalnu populaciju 	<ul style="list-style-type: none"> • Nije primjenjiv na sve vrste • Način uzgoja može utjecati na izloženost i biološke odgovore organizma • Ukazuje samo na kratkoročni utjecaj zagađenja • Pristup hrani/briga o organizmima • Ne postoji standardizirana metodologija • Primjenjuje se rijetko • Dobrobit životinja • Kavezni uzgoj može utjecati na zdravstveno stanje organizma, a time i bioakumulaciju • Nisu realni uvjeti izloženosti, posebno utjecaj sedimenta

Pasivni monitoring, tj. uzorkovanje nativnih vodenih organizama na odabranim lokacijama je metoda koja se najčešće koristi i za koju je razvijena standardna metodologija biomonitoringa. Glavne prednosti te metode su da daje mogućnost ocjene dugoročnog utjecaja zagađenja i da je primjenljiva (uz odgovarajući izbor vrsta) istovremeno na velikom broju lokacija. Za razliku od pasivnog, aktivni monitoring (korištenje uzgajanih organizama) daje uvid samo u kratkoročne efekte zagađenja (vrijeme trajanja uzgoja), ograničen je na odabrane lokacije gdje se provodi uzgoj, kao i na mali broj vrsta koje se mogu uzgajati. Zbog toga se aktivni monitoring preporuča samo na lokacijama gdje nije moguće uzorkovanje nativnih organizama, a potrebno je provesti biomonitoring i ocijeniti akumulaciju prioriternih tvari u bioti.

3.2.1. Preporuke za provođenje pasivnog biomonitoringa

Pasivni monitoring uključuje uzorkovanje organizama koji obitavaju na izabranoj lokaciji istraživanja, a odabrane vrste organizama trebaju po mogućnosti zadovoljiti sljedeće kriterije:

- Rasprostranjenost i zastupljenost u području istraživanja
- Eurivalentne vrste (podnose velika kolebanja okolišnih čimbenika) koje su široko rasprostranjene u zemlji u kojoj se provodi monitoring; iako je korištenje različitih vrsta obično neizbježno, svakako treba težiti korištenju što manjeg broja vrsta
- Vežanost za područje (sedentarni organizmi koji odražavaju lokalni stupanj zagađenja)
- Dugoživuće vrste koje omogućavaju bioakumulaciju zagađivala u dužem periodu (po mogućnosti od 3 do 5 godina starosti za ribe)
- Veličina jedinki koja omogućava prikupljanje dovoljne količine tkiva za analizu
- Nisu zaštićene vrste i njihovo uzorkovanje ne ugrožava socioekonomske interese
- Nalaze se na trofičkom nivou koji odgovara cilju zaštite (po mogućnosti TL = 3,5-4,5 za ribe)

Izbor odgovarajućih vrsta donosi se na bazi postojećih saznanja i nacionalnih baza podataka o vrstama u područjima gdje se provodi monitoring, uzimajući u obzir gore navedene kriterije. U Europi je nemoguće odabrati jednu vrstu koja bi se koristila u više zemalja s obzirom na velike klimatske razlike. Također se često unutar jednog riječnog sustava koristi jedna vrsta u gornjem, brzinskom toku, a druga vrsta u donjem, mirnom dijelu rijeke. Najčešće korištene vrste riba u biomonitoringu u Europskim rijekama su pastrva, klen, mrena, grgeč i deverika. Konačni izbor vrste obično je kompromis između vrste koja zadovoljava većinu potrebnih kriterija i vrste koju se realno može uzorkovati u dovoljnom broju i na većini lokacija na kojima se monitoring provodi.

Niz bioloških faktora utječe na akumulaciju tvari u organizme, kao što su prehrana, nivo u prehrambenom lancu, količina masti, veličina i starost, spol, migracije i sezona. U riba je jedan od najvažnijih faktora njihova veličina, odnosno starost. Zbog toga bi bilo poželjno da se uzorkuju ribe unutar određenih veličinskih granica, tj. relativno definirane starosti te da se iz veličine ribe procijeni njezina starost koristeći podatke o lokalnim populacijama u nacionalnim bazama podataka. Ako postoji mogućnost, bilo bi poželjno odrediti starost ribe koristeći i otolite ili škrge. Preporučena starost riba za biomonitoring je 3-5 godina, ali s obzirom da tu preporuku često nije moguće slijediti, potrebno je barem uvijek uzorkovati istu vrstu riba u definiranom rasponu veličine. Preporuča se odrediti i kondicijski faktor (CF = engl. condition factor) riba prema Rätz and Lloret (2003): ukupna masa x totalna dužina⁻³ (g cm⁻³ x 100), za što je potrebno odrediti totalnu dužinu i masu ribe, iako nije pokazano da CF znatno utječe na akumulaciju zagađivala, osim u ekstremnim slučajevima pothranjenosti riba. Premda spol može utjecati na koncentraciju zagađivala, taj utjecaj je mali te s obzirom na činjenicu da određivanje spola nije jednostavno, nije potrebno odrediti spol. Utjecaj sezone na koncentracije zagađivala u tkivu može biti značajan zbog reprodukcijuskog ciklusa, posebno direktno prije i nakon mrijesta. Zbog toga je potrebno izbjegavati uzorkovanje riba i školjkaša direktno prije i nakon sezone mrijestjenja.

3.3. Obrada i prikaz rezultata

3.3.1. Normalizacija na sadržaj masti i suhe tvari

Normalizacija koncentracija zagađivala izmjerenih u bioti na sadržaj masti ili suhe tvari omogućava bolju usporedbu podataka u različitim Europskim zemljama te pomaže kod procjene bioakumulacijskog potencijala za pojedine vrste u usporedbi s koncentracijama tih tvari u vodi. Premda normalizacija izmjerenih koncentracija na standardni sadržaj masti odnosno suhe tvari u bioti može biti korisna pri usporedbi ocjene usklađenosti stanja u različitim Europskim zemljama, njezino korištenje se ne preporuča za ocjenu usklađenosti u lokalnim sustavima, tj. u pojedinim zemljama.

Za hidrofobne prioritetne tvari koje imaju afinitet akumulacije u masnim tkivima riba izmjerene koncentracije mogu biti normalizirane na prosječni sadržaj masti (EC, 2011). Osnova za normalizaciju na sadržaj masti je pretpostavka da je sadržaj prioritetne tvari u masti proporcionalan sadržaju te tvari u cijelom organizmu. Za prioritetne tvari koje se ne akumuliraju u masnom tkivu, kao što je npr. živa, normalizacija se može provesti na sadržaj suhe tvari.

Vrijednosti sadržaja masti i suhe tvari u ribama i školjkašima na koje treba provesti normalizaciju koncentracija tvari izmjerenu u mokrim tkivima preporučene su na europskom nivou. Za normalizaciju na sadržaj masti koncentracije prioritetnih tvari izmjerene u ribama se normaliziraju na 5 % masti (EC, 2011), dok se za školjkaše normaliziraju na 1 % masti. Za normalizaciju na suhu težinu kod riba se koristi standardni sadržaj suhe tvari od 26 %, a kod školjkaša 8,3 % (EFSA, 2009). Kako bi se provela normalizacija potrebno je izmjeriti sadržaj masti i suhe tvari u analiziranim uzorcima. U tu svrhu bi se mogli koristiti i podaci za sadržaj masti i suhe tvari za analizirane vrste iz FishBase, ali se zbog varijabilnosti tih podataka za prirodne uzorke preporuča određivanje sadržaja masti i suhe tvari u stvarnim uzorcima.

Izračun koncentracija normaliziranih na sadržaj masti ($\text{konc}_{\text{norm,masti}}$) i na sadržaj suhe tvari ($\text{konc}_{\text{norm,s.t.}}$) iz izmjerenih koncentracija ($\text{konc}_{\text{izmj}}$) provodi se prema slijedećim formulama:

Za ribe:

$\text{konc}_{\text{norm,masti}} = \text{konc}_{\text{izmj}} \times 0,05/\text{sadržaj masti}$ i $\text{konc}_{\text{norm,s.t.}} = \text{konc}_{\text{izmj}} \times 0,26/\text{sadržaj suhe tvari}$

Za školjkaše:

$\text{konc}_{\text{norm,masti}} = \text{konc}_{\text{izmj}} \times 0,01/\text{sadržaj masti}$ i $\text{konc}_{\text{norm,s.t.}} = \text{konc}_{\text{izmj}} \times 0,083/\text{sadržaj suhe tvari}$

Za rakove:

U preporukama za provedbu Monitoringa (EC, 2014a) nije definiran sadržaj masti i suhe tvari na koje treba provoditi normalizaciju koncentracija.

3.3.2. Utjecaj trofičkog nivoa na ocjenu sukladnosti sa SKVO_{biota}

Vrste organizama koje su najviše izložene akumulaciji prioriternih tvari su one koje se nalaze na vrhu vodenog prehrambenog lanca i najpogodnije su za primjenu standarda za biotu. Za one tvari koje su podložne biomagnifikaciji (povećavanju koncentracije kroz stupnjeve prehrambenog lanca) kritična koncentracija se obično dostiže na trofičkom nivou (TL) 3 do 4 za slatkovodni prehrambeni lanac. Bioakumulacija u prehrambenom lancu karakteristika je većine prioriternih tvari za koje su definirani SKVO_{biota}, osim za PAH-ove (fluoranten i benzo(a)piren), koji se puno više akumuliraju na nižim nivoima prehrambenog lanca, odnosno TL = 2. Zbog toga se ne preporuča određivati PAH-ove u ribama, već ih treba određivati u školjkašima ili rakovima. Smatra se da se grabežljivci na koje se odnosi zaštita (sisavci i ptice) uglavnom nalaze na trofičkom nivou 4,5 u slatkovodnom prehrambenom lancu. To znači da se organizmi kojima se hrane nalaze na trofičkom nivou 3,5 u slatkovodnom prehrambenom lancu. Podaci o konzumaciji slatkovodne ribe u Europi pokazuju da se konzumiraju uglavnom vrste koje se nalaze na trofičkom nivou oko 4 (srednji trofički nivo iz FishBase je 3,8). Zbog toga je SKVO_{biota} za ribe definiran za vrste riba koje se nalaze na TL = 3,5 - 4,5.

Organizmi koji se uzorkuju u okviru monitoringa i u kojima se određuju prioritne tvari trebali bi biti na sličnom položaju u trofičkom lancu kao i organizmi za koje su definirani SKVO_{biota}. Trofički nivo nije čvrsto zadan za svaku vrstu, nego može varirati od jednog ekosustava do drugog pa čak i od jedne jedinke do druge. To znači da bi za svaku lokalnu vrstu koja se koristi za analizu prioriternih tvari trebalo odrediti na kojem nivou prehrambenog lanca se nalazi. Određivanje položaja u prehrambenom lancu provodi se pomoću određivanja omjera stabilnih izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) na različitim stupnjevima trofičkog lanca prema formuli:

$$\text{TL} = ((\delta^{15}\text{N}(\text{riba}) - \delta^{15}\text{N}(\text{školjkaš}))/3,4 + 2$$

u kojoj 3,4 predstavlja faktor trofičkog obogaćenja (TMF, engl. trophic magnification factor), koji predstavlja faktor obogaćenja za svaki naredni stupanj i opisuje prosječno povećanje koncentracije tvari od jednog nivoa na drugi, a preporučeno je da se za TMF koristi vrijednost 3,4 (EC, 2014b).

S obzirom da nije uvijek moguće uzorkovati ribe na odgovarajućem nivou u prehrambenom lancu, preporuča se ili preračun postojećih SKVO_{biota} na drugi trofički nivo, ili preračun izmjerenih koncentracija na standardni trofički nivo za koji je definiran SKVO_{biota}. Kada je SKVO_{biota} definiran za niži trofički nivo (npr. za PAH-ove) preračun s nižeg na viši trofički nivo se ne preporuča zbog toga što se ti spojevi metaboliziraju u ribama, a taj proces „biorazrjeđivanja“ (suprotan biomagnifikaciji) nije moguće odgovarajuće kvantificirati. Preračunavanje vrijednosti SKVO_{biota} u SKVO_{biota,x}, tj. na trofički nivo „x“ koji odgovara organizmima na kojima se vršio monitoring, ili pak preračunavanje izmjerene koncentracije na standardni trofički nivo (npr. TL = 4) za koji je definiran SKVO_{biota} vrši se prema formulama:

$$\text{SKVO}_{\text{biota},x} = \text{SKVO}_{\text{biota}}/\text{TMF}^{(4-\text{TL}(X))} \quad \text{ili} \quad \text{konc}_{\text{TL-kor}} = \text{konc}_{\text{izm}}/\text{TMF}^{(4-\text{TL}(X))}$$

S obzirom da je određivanje trofičkog nivoa za lokalne riblje vrste vrlo zahtjevno, a korekcije izmjerenih podataka na drugi trofički nivo (prije svega zbog nepouzdanosti faktora TMF za lokalne prehrambene lance) mogu uvesti velike pogreške u sustav ocjene usklađenosti sa $SKVO_{biota}$, ne preporuča se korištenje tih korekcija u okviru monitoringa. Bilo bi međutim poželjno mjeriti koncentracije u ribama koje su na $TL = 3,5 - 4,5$ za koje su definirani $SKVO_{biota}$. Ukoliko to nije moguće svakako treba za korištene vrste riba prikupiti podatke o trofičkom nivou na kojem se nalaze, ili iz dostupnih baza podataka (FishBaze), ili, što bi bilo poželjnije, konkretne podatke za te vrste riba.

3.3.3. Opis primjene pasivnih uzorkivača kao alternativa monitoringu prioriternih tvari u bioti

Pasivni uzorkivači mogu biti korišteni za procjenu prisutnosti prioriternih tvari u vodi i njihovu dostupnost za vodene organizme, jer se njima procjenjuje otopljeni frakcija tvari koja se može biokoncentrirati u organizmima. Dakle tim pristupom može se *in situ* odrediti koncentracija bioakumulativnih organskih spojeva kojima su izloženi organizmi na najnižem trofičkom nivou. Vodič preporuča upotrebu takvih uzorkivača za preliminarno utvrđivanje lokacija na kojima je koncentracija prioriternih tvari povišena i za određivanje lokacija na kojima bi trebalo provoditi monitoring u bioti. Prilikom preliminarnog ispitivanja potrebno je primjenu pasivnih uzorkivača provoditi paralelno s monitoringom beskralježnjaka kako bi se utvrdila kvantitativna povezanost između koncentracije prioriternih tvari u vodi određene pomoću uzorkivača i one akumulirane u bioti, što onda omogućava usklađivanje sa $SKVO_{biota}$.

Pasivni uzorkivači akumuliraju hidrofobne tvari iz vode jer su one znatno topljivije u materijalu koji je ugrađen u uzorkivač nego u vodi. Uzorkivači rade na principu razdjeljivanja tvari između materijala uzorkivača i vode. Najčešće su napravljeni od hidrofobnog polimernog materijala visoke propusnosti kao što je to polietilen niske gustoće (LDPE) ispunjenog lipidima (polupropusne membrane – SPMD), ili bez lipida, a mogu sadržavati i silikonsku gumu (polidimetilsiloksan – PDMS) ili polioksometilen. Pasivni uzorkivači se izlažu u vodi obično u dužem periodu (2-8 tjedana), a koncentracija organskih tvari akumuliranih u uzorkivaču u pravilu je proporcionalna koncentraciji u vodi i daje podatak o prosječnoj koncentraciji u periodu izlaganja. Detaljan postupak određivanja otopljene koncentracije organskih tvari u vodi pomoću pasivnih uzorkivača opisan je u standardu ISO (ISO, 2011). Pomoću pasivnih uzorkivača koji rade na principu razdjeljivanja mogu se određivati hidrofobne supstance kao što su PCB-ovi i PAH-ovi. Također postoje i pasivni uzorkivači za hidrofilnije organske spojeve kao što su PFOS i tributil kositar (TBT) koji rade na principu adsorpcije. Za sada nema komercijalnih pasivnih uzorkivača za monitoring žive.

Primjenjivost pasivnih uzorkivača za procjenu koncentracije u bioti uspješno je testirana za PCB-ove i PAH-ove u dugogodišnjem monitoringu (12 godina) koje je provedeno u Nizozemskoj. Za pasivne uzorkivače korištena je procedura koju je preporučio OSPAR/ICES (Smedes i Booij, 2012), a rezultati su uspoređeni s podacima iz redovnog

monitoringa koji se provodio u dagnjama. Rezultati su pokazali da su koncentracije PAH-ova i PCB-ova izmjerene pomoću pasivnih uzorkivača bile vrlo dobro korelirane s koncentracijama izmjerenim u dagnjama, ukazujući da su pasivni uzorkivači pogodni za procjenu stupnja izloženosti dagnji tim spojevima.

Dakle pasivni uzorkivači bi se načelno mogli koristiti za monitoring fluorantena i benzo(a)pirena u slatkovodnim sustavima u kojima nije moguće uzorkovanje beskralježnjaka (školjkaša ili rakušaca). Međutim, kao prvo bi trebalo provesti metodu validacije s nekim organizmom u kojoj bi se utvrdila kvantitativna povezanost koncentracije dobivene pomoću uzorkivača i one u bioti. Nakon toga bi se eventualno mogao provoditi monitoring pomoću pasivnih uzorkivača. Međutim, to je metoda koja još nije u prihvaćena u EU i predložena je za korištenje samo u nekim zemljama, kao npr. Nizozemskoj (Smedes i sur., 2010). Cijena uzorkivača vrlo je visoka (nekoliko tisuća eura), ali nizozemski predlagači tvrde da je zbog smanjenja frekvencije uzorkovanja odnos cijene i kvalitete bolji za pasivne uzorkivače. O primjeni ove tehnike trebalo bi razmisliti za lokacije na kojima se utvrdi zagađenje PAH-ovima putem analize sedimenta i vode, a na kojima nisu prisutni odgovarajući organizmi pomoću kojih bi se moglo ustanoviti do koje mjere je to zagađenje dostupno bioakumulaciji u biotu.

4. PROBLEM USKLAĐIVANJA REZULTATA MONITORINGA BIOTE SA SKVO_{biota} ZA NEKE PRIORITETNE TVARI

Nakon što se monitoring biote za prioritetne tvari počeo provoditi u zemljama Europske unije pokazalo se da su neke od definiranih SKVO vrijednosti za ribe tako niske da gotovo sva mjerenja u uzorcima slatkovodnih i morskih riba pokazuju višestruko veće koncentracije od SKVO_{biota} vrijednosti.

Najveći problem u tom smislu predstavlja vrlo niska vrijednost za SKVO za Hg u ribama (20 µg/kg m.t.) koja je definirana za zaštitu od sekundarnog trovanja ptica i sisavaca koji se hrane ribama. Svi dostupni podaci o koncentracijama Hg u slatkovodnim i morskim ribama, pogotovo za vrste koje zadovoljavaju zahtjeve za monitoring (svežderi ili mesojedi, starost 3-5 godina, TL = 3,5 - 4,5) znatno su viši od te SKVO vrijednosti (Živković i sur., 2017; OSPAR 2016; Vignati i sur., 2013). OSPAR-ova komisija je u 2016. godini napravila studiju „Procjena žive u morskom okolišu, usporedba kriterija (EAC/EQS) za živu“ u kojoj je pokazano da uz primjenu SKVO kriterija (uz korekciju na traženi trofički nivo za školjkaše i ribe koje se nalaze na nižim TL) niti jedna od 12 europskih zemalja koja sudjeluje u monitoringu u okviru OSPARA nije zadovoljila SKVO kriterij za Hg. U istom izvješću se, međutim, navodi da je s ekotoksikološkog aspekta SKVO za Hg opravdano tako nizak, premda je napomenuto da su laboratorijska ekotoksikološka ispitivanja u stvari nedostatna. U istom izvješću je naglašeno da korekcije na potreban trofički nivo ne bi trebalo provoditi koristeći generičke podatke o TL za pojedine organizme, nego da bi trebalo odrediti TL za analizirane vrste u lokalnim vodenim sustavima, jer upotreba generičkih podataka dovodi do velikih pogrešaka. U kratkom osvrtu na to kako zemlje članice mogu pristupiti problemu nezadovoljavanja

kriterija za SKVO za biotu za Hg Vignati i sur. (2013) navode nekoliko opcija koje se mogu razmotriti: korištenje SKVO bazirano na koncentraciji Hg u vodi; mjerenje Hg u nižim organizmima, npr. školjkašima, ili prilagođavanje SKVO vrijednosti pojedinoj zemlji ovisno o nivou Hg u ribama (određivanje lokalnih bazičnih koncentracija). Međutim, u diskusiji autori odbacuju sve te tri ideje kao rješenje i predlažu da se počne provoditi prošireni monitoring Hg u bioti koji bi omogućio definiranje raspona koncentracija za pojedine organizme i vremenskih trendova, a onda i posljedično možda omogućio donošenje manje striktnih kriterija za SKVO za Hg u bioti. Naime bioakumulacija i biomagnifikacija Hg u vodenom trofičkim lancu je izuzetno kompleksna i u velikoj mjeri ovisi o biogeokemijskim karakteristikama samog sustava, a ne samo o stupnju zagađenja okoliša živom (Cossa i sur., 2012).

Za polibromirane difeniletere (PBDE) također je postavljena vrlo niska vrijednost za SKVO za biotu od 0,0085 µg/kg m.t. Rezultati znanstvenih istraživanja u riječnim ribama diljem Europe (Eljarrat i Barcelo, 2018) i monitoringa morske biote (HELCOM, 2018) pokazuju da je trenutačno situacija takva da sve mjerene koncentracije daleko premašuju SKVO za PBDE. Premda višegodišnji trendovi u morskim (HELCOM, 2018) i slatkovodnim (Eljarrat i Barcelo, 2018) ribama pokazuju da se koncentracije PBDE-ova u ribama smanjuju, jer upotreba PBDE-ova opada nakon što je njihovo korištenje zabranjeno u Europskoj uniji 2004. godine, nije za očekivati da će navedeni kriterij biti dosegnut do 2021. godine, kako je traženo u Europskoj direktivi. Dakle u okviru monitoringa biote u slatkovodnim ekosustavima svakako bi trebalo provoditi monitoring PBDE-ova u bioti da se utvrde trendovi smanjenja njihove koncentracije.

5. IZBOR VRSTA RIBA ZA ODREĐIVANJE PRIORITETNIH TVARI U POVRŠINSKIM KOPNENIMA VODAMA

Republika Hrvatska je poznata po iznimnoj raznolikosti ihtiofaune, posebno bogatstvom vrsta i endema, što je čini jednom od ihtiološki najraznolikijih zemalja Europe. Bogatstvo vrsta posljedica je zemljopisnog položaja te geološke prošlosti. U slatkim vodama Republike Hrvatske živi oko 140 ribljih svojti od čega crnomorski ili dunavski slijev nastanjuje 87 ribljih svojti (67 autohtonih i 20 stranih vrsta), a jadranski 80 vrsta (10 stranih vrsta i 13 translociranih) (Duplić, 2008). Južni dio Hrvatske jedno je od najvažnijih središta raznolikosti ihtiofaune u Europi s velikim brojem endema. Na tom se području u budućnosti mogu očekivati otkrića novih vrsta.

Rijeke prema zajednici riba možemo podijeliti u zone pa se sastav zajednice riba mijenja kako se mijenjaju ekološki uvjeti u toku. Najuzvodnija zona je zona pastrve koju karakterizira brz tok i hladna voda bogata otopljenim kisikom. Broj vrsta u toj je zoni relativno malen i dominiraju reofilne vrste: pastrva, pijor, lipljen i mladica. Sljedeća je zona mreke koju karakterizira manje brzi tok te voda koja ljeti premašuje 15°C i siromašnija je kisikom. Karakteristične vrste za tu zonu su mreka, klen i podust. Sljedeća je zona deverike koju karakterizira još sporiji tok s temperaturom vode ljeti preko 20°C i još nižim razinama kisika. Tipične vrste te zone su deverika, šaran i jez (Duplić, 2008).

Naravno, ova se zonacija primjenjuje samo na velikim i dugačkim rijekama pa je za manje tekućice i sve stajaćice potrebno primijeniti drugu metodologiju. Posebno je važno naglasiti raznolikost riba u jadranskom slivu u kojem prethodno spomenuta zonacija ne vrijedi i u kojem gotovo svaka rijeka ima svoju jedinstvenu riblju zajednicu.

Uzevši u obzir iznimnu raznolikost riba Republike Hrvatske te geografsku poziciju koja uključuje dva sliva, odabrane su vrste riba koje su karakteristične za pojedine regije, koje ne migriraju ili migriraju manje od 30 km, koje su srednjeg trofičkog nivoa, koje su srednjoživiće te se relativno lako mogu uloviti u svim staništima u dovoljnim količinama za provođenje potrebnih analiza. Osim toga, odabrane ribe su, u područjima gdje je to moguće, od malog ekonomskog interesa i nisu posebno zaštićene. U Tablici 5.1. prikazane su odabrane vrste riba s naznačenom dobi i totalnom dužinom tijela koja se treba uzorkovati te razdoblju u kojem se ribe trebaju uzorkovati.

Tablica 5.1. Odabrane vrste riba, dob, dužina i vrijeme uzorkovanja te period mrijesta

Vrsta riba	Znanstveno ime	Starost (godine)	Totalna dužina (mm)	Vrijeme uzorkovanja	Period mrijesta
dvoprugasta uklija	<i>Alburnoides bipunctatus</i>	3 do 5	80 do 140	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
uklija	<i>Alburnus alburnus</i>	3 do 5	80 do 140	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
patuljasti somić	<i>Ameiurus melas</i>	3 do 5	130 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
jegulja	<i>Anguilla anguilla</i>	3 do 5	300 do 550	15.4. do 30.9.	-
potočna mrena	<i>Barbus balcanicus</i>	3 do 5	120 do 200	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
mren	<i>Barbus plebejus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
babuška	<i>Carassius gibelio</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
štuka	<i>Esox lucius</i>	1 do 3	300 do 700	15.4. do 30.9.	1.2. do 31.3.
jez	<i>Leuciscus idus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
grgeč	<i>Perca fluviatilis</i>	3 do 5	120 do 190	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
basak	<i>Rutilus basak</i>	3 do 5	120 do 170	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
bodorka	<i>Rutilus rutilus</i>	3 do 5	100 do 140	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
primorska pastrva	<i>Salmo farioides</i>	3 do 5	100 do 250	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.
potočna pastrva	<i>Salmo trutta</i>	3 do 5	100 do 250	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.
drlja	<i>Scardinius dergle</i>	3 do 5	120 do 170	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.

Vrsta riba	Znanstveno ime	Starost (godine)	Totalna dužina (mm)	Vrijeme uzorkovanja	Period mrijesta
peškelj	<i>Scardinius plotizza</i>	3 do 5	120 do 170	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
klen	<i>Squalius cephalus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
ilirski klen	<i>Squalius illyricus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
bijeli klen	<i>Squalius squalus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
zrmanjski klen	<i>Squalius zrmanjæ</i>	3 do 5	100 do 200	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.

5.1. Ugroženost i zaštita odabranih vrsta riba

Pregled statusa ugroženosti i zaštite odabranih riba prikazan je u tablici 5.1.1.

Tablica 5.1.1. Status ugroženosti i zaštite odabranih vrsta riba

Znanstveno ime	Direktiva o staništima	Bernska konvencija	Hrvatski Crveni popis	Stupanj zaštite
<i>Alburnoides bipunctatus</i>		III	LC	-
<i>Alburnus alburnus</i>			-	-
<i>Ameiurus melas</i>			-	-
<i>Anguilla anguilla</i>	V		VU	strogo zaštićena samo u Vranskom jezeru kod Biograda i u NP Krka
<i>Barbus balcanicus</i>	II, V	III	-	-
<i>Barbus plebejus</i>	II, V	III		strogo zaštićena samo unutra granica PP Velebit
<i>Carassius gibelio</i>			-	-
<i>Esox lucius</i>			-	-
<i>Leuciscus idus</i>			VU	-
<i>Perca fluviatilis</i>			-	-
<i>Rutilus basak</i>			NT	-
<i>Rutilus rutilus</i>			-	-
<i>Salmo farioides</i>			EN	-
<i>Salmo trutta</i>			VU	-
<i>Scardinius dergle</i>			NT	-
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>			-	-
<i>Scardinius plotizza</i>			DD	-
<i>Squalius cephalus</i>			-	-
<i>Squalius illyricus</i>		III	VU	-
<i>Squalius squalus</i>			-	-
<i>Squalius zrmanjæ</i>			VU	strogo zaštićena samo unutra granica PP Velebit

Sve odabrane vrste u dunavskom slivu nisu zaštićene niti bi uzorkovanje u potrebnim količinama moglo ugroziti populaciju. U jadranskom su slivu strogo zaštićene mren, jegulja i zрманjski klen, ali samo u određenim područjima, odnosno na područjima nacionalnih parkova i parkova prirode kako je naznačeno u tablici (Mrakovčić i sur., 2006).

5.2. Ekologija odabranih vrsta riba

Podjela vrsta u ekološke grupe omogućuje podatke o strukturnom i funkcionalnom sastavu zajednice riba. Kako bi se procijenila struktura zajednice riba i ekološke značajke, svakoj zabilježenoj vrsti dodijeljena je pripadnost pojedinoj ekološkoj grupi na temelju vlastitih zapažanja te literaturnih podataka (Kottelat i Freyhof, 1972). Za potrebe analize u ovoj studiji ograničili smo se na podjelu vrsta u ekološke grupe koje se najčešće koriste u analizama (Tablica 5.2.1.).

Vrste riba odabrane za potrebe ovog istraživanja su po stanišnim grupama podijeljene u 3 kategorije: reofilne, limnofilne i euritopne, pri čemu reofilne vrste preferiraju tekuću vodu, limnofilne stajaću, a euritopne vrste nemaju posebne preferencije prema nekom tipu staništa tj. koriste oba tipa bez problema. Podjela na hranidbene grupe prilagođena je ihtiofauni europskih voda. Svaka vrsta je dodijeljena jednoj od prehrambenih grupa prema dominantnom sastavu hrane odrasle jedinke. Vrste odabrane za potrebe ovog istraživanja su kukcožderi, svežderi, ribožderi-kukcožderi i ribožderi (Tablica 5.2.1.).

Klasifikacije u reproduktivne grupe napravljena je prema značajkama reproduktivnog staništa, odnosno prema ekološkim uvjetima mjesta na koja se polažu jaja. Riba odabrane za potrebe ovog istraživanja su litofili, fitofili i fito-litofili. Većina odabranih vrsta riba po grupama tolerancije, odnosno prema osjetljivosti vrsta na specifične pritiske, spada u tolerantne ili srednje tolerantne vrste (Tablica 5.2.1.). Osjetljivost vrsta u prirodnim uvjetima vrlo je teško procijeniti te je stoga i prilično teško definirati osjetljivost riba jer zahtijeva opsežne podatke o biologiji i ekologiji pojedine vrste. Na primjer, pojedina zajednička značajka tolerancije rezultat je kombinacije obiju zasebnih značajki. Pojedine vrste imaju veću toleranciju na promjene u fizikalno-kemijskoj kakvoći vode, a manju prema hidromorfološkim promjenama staništa pa je kod tih vrsta prednost dana onoj značajki koja ih više karakterizira. Netolerantne vrste su karakteristične za gornje tokove rijeka pa ih se nije moglo izbjeći kako bi se pokrila sva staništa.

Odabrane vrste riba po dužini života spadaju u kratkoživuće, srednježivuće i dugoživuće vrste. Kratkoživuće vrste žive manje od 5 godina, srednježivuće vrste žive 5 do 15 godina, a dugoživuće vrste žive više od 15 godina. Potrebno je napomenuti da sve odabrane vrste dožive 5 godina. Što se tiče migratornih grupa, odabrane vrste spadaju u skupine riba koje ne migriraju ili koje migriraju na udaljenostima manjima od 30 km (Tablica 5.2.1.). Jedina je iznimka jegulja koja poduzima duge migracije i mrijesti se u Sargaškom moru. Ipak, jegulja se mrijesti samo jednom u životu i za vrijeme slatkovodne faze ne migrira što je čini pogodnom vrstom za ovu vrstu istraživanja.

Tablica 5.2.1. Ekološki zahtjevi odabranih vrsta riba

Vrsta riba	Znanstveno ime	Stanišna grupa	Prehrambena grupa	Stanište hranjenja	Trofički nivo	Reproduktivna grupa	Tolerancija	Dužina života	Migracije
dvoprugasta uklija	<i>Alburnoides bipunctatus</i>	reofilna	kukcožder	vodeni stupac	2,9 ± 0,35	litofil	netolerantna	kratkoživuća	ne migrira
uklija	<i>Alburnus alburnus</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	2,7 ± 0,29	fito-litofil	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
patuljasti somić	<i>Ameiurus melas</i>	limnofilna	svežder	dno	3,8 ± 0,4	fitofil	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
jegulja	<i>Anguilla anguilla</i>	euritopna	svežder	dno	3,6 ± 0,3	-	tolerantna	dugoživuća	duge
potočna mrena	<i>Barbus balcanicus</i>	reofilna	svežder	dno	3,2 ± 0,4	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke
mren	<i>Barbus plebejus</i>	reofilna	svežder	dno	3,4 ± 0,51	litofil	tolerantna	dugoživuća	kratke
babuška	<i>Carassius gibelio</i>	euritopna	svežder	dno	2,5 ± 0,0	fitofil	tolerantna	dugoživuća	kratke
štuka	<i>Esox lucius</i>	euritopna	ribožder	vodeni stupac	4,1 ± 0,4	fitofil	srednje tolerantna	dugoživuća	kratke
jez	<i>Leuciscus idus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	3,8 ± 0,59	fito-litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
grgeč	<i>Perca fluviatilis</i>	euritopna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	4,4 ± 0,0	fito-litofil	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
basak	<i>Rutilus basak</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	3,0 ± 0,2	fito-litofil	tolerantna	srednježivuća	kratke
bodorka	<i>Rutilus rutilus</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	3,0 ± 0,0	fito-litofil	tolerantna	srednježivuća	kratke
primorska pastrva	<i>Salmo farioides</i>	reofilna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	3,5 ± 0,5	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke
potočna pastrva	<i>Salmo trutta</i>	reofilna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	3,4 ± 0,1	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke
drlja	<i>Scardinius dergle</i>	limnofilna	svežder	vodeni stupac	2,9 ± 0,39	fitofil	srednje tolerantna	srednježivuća	ne migrira
crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	limnofilna	svežder	vodeni stupac	2,9 ± 0,39	fitofil	srednje tolerantna	srednježivuća	ne migrira
peškelj	<i>Scardinius plotizza</i>	limnofilna	svežder	vodeni stupac	2,9 ± 0,39	fitofil	srednje tolerantna	srednježivuća	ne migrira

Vrsta riba	Znanstveno ime	Stanišna grupa	Prehrambena grupa	Stanište hranjenja	Trofički nivo	Reproduktivna grupa	Tolerancija	Dužina života	Migracije
klen	<i>Squalius cephalus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$2,7 \pm 0,1$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
ilirski klen	<i>Squalius illyricus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,5 \pm 0,37$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
bijeli klen	<i>Squalius squalus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,4 \pm 0,5$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
zrmanjski klen	<i>Squalius zrmanjæ</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,4 \pm 0,4$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke

5.3. Trofički nivo odabranih vrsta riba

Trofički nivo odabranih vrsta prikazan je u Tablici 5.3.1. Gdje je bilo moguće, odabirane su ribe sa što višim trofičkim nivoom. Trofički nivoi dostupnih vrsta riba preuzeti su iz baze stranice Fishbase (www.fishbase.org). Trofički nivo nekih vrsta je još uvijek nepoznat pa je procijenjen na osnovu najbližih srodnika i u tablici je prikazan u kurzivu.

Tablica 5.3.1. Trofički nivo odabranih vrsta riba

Znanstveno ime	Trofički nivo
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	2,9 ± 0,35
<i>Alburnus alburnus</i>	2,7 ± 0,29
<i>Ameiurus melas</i>	3,8 ± 0,4
<i>Anguilla anguilla</i>	3,6 ± 0,3
<i>Barbus balcanicus</i>	3,2 ± 0,4
<i>Barbus plebejus</i>	3,4 ± 0,51
<i>Carassius gibelio</i>	2,5 ± 0,0
<i>Esox lucius</i>	4,1 ± 0,4
<i>Leuciscus idus</i>	3,8 ± 0,59
<i>Perca fluviatilis</i>	4,4 ± 0,0
<i>Rutilus basak</i>	3,0 ± 0,2
<i>Rutilus rutilus</i>	3,0 ± 0,0
<i>Salmo farioides</i>	3,5 ± 0,5
<i>Salmo trutta</i>	3,4 ± 0,1
<i>Scardinius dergle</i>	2,9 ± 0,39
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	2,9 ± 0,39
<i>Scardinius plotizza</i>	2,9 ± 0,39
<i>Squalius cephalus</i>	2,7 ± 0,1
<i>Squalius illyricus</i>	3,5 ± 0,37
<i>Squalius squalus</i>	3,4 ± 0,5
<i>Squalius zrmanjiae</i>	3,4 ± 0,4

6. IZBOR BESKRALJEŽNJAKA ZA ODREĐIVANJE PRIORITETNIH TVARI U POVRŠINSKIM KOPNENIMA VODAMA

Izbor beskralješnjaka sveden je na školjkaše porodice Unionidae, koje su relativno dostupne na istraživanim staništima. Treba napomenuti da je izuzetak obična lisanka, *Unio crassus* Philipsson, 1788, odnosno vrsta koja je zbog velikog smanjenja brojnosti vrste proglašena ugroženom te se nikako ne smije uzorkovati. Prilikom sličnih istraživanja, ovisno o dostupnosti, mogu se koristiti i amfipodni rakovi iz porodice Gammaridae.

Porodica Unionidae (lisanke) su isključivo slatkovodni školjkaši koji često osvajaju nova područja, a to je jedna od osobitosti njihovog životnog ciklusa. Najviše ih je u Sjevernoj Americi. Obitavaju u tekućicama: rijekama i potocima (Bauer, 2001). Vrste iz porodice

Unionidae su karakteristični predstavnici slatkovodnih školjkaša s velikim područjem rasprostranjenosti. Karakterizira ih raznolikost oblika i boje ljuštore koje su uvjetovane područjem koje nastanjuju (Killeen i sur., 2004). Od ukupnih slatkovodnih mekušaca Europe, slatkovodni školjkaši čine 6 %. Raznolikost europskih slatkovodnih školjkaša je relativno mala u usporedbi sa faunom Sjeverne Amerike i Afrike. U Europi se nalazi 14 vrsta porodice Unionidae te 4 endemične vrste (Cuttelod i sur., 2011). U Hrvatskoj su prisutne slijedeće vrste: bezupka - *Anodonta cygnea* Linnaeus, 1758; *Anodonta anatina* Linnaeus, 1758; *Pseudanodonta complanata* Rossmässler, 1835; obična lisanka - *Unio crassus* Philipsson, 1788; slikarska lisanka - *Unio pictorum* Linnaeus, 1758; *Unio tumidus* Philipsson, 1788; *Unio mancus* Lamarck, 1819; *Microcondylaea bonellii* Ferussac, 1827 (Matoničkin i sur., 1998; Cuttelod i sur., 2011). Stanište porodice Unionidae su jezera, potoci i rijeke u kojima kao sediment prevladava pijesak i šljunak. Zbog bogatstva hrane u rijekama je, za razliku od potoka, zabilježena i veća raznolikost vrsta. Općenito govoreći Unionidae se hrane bakterijama i mikroplanktonom. Za razliku od odraslih, ličinka glodihija se hrani tkivom domaćina na kojemu se nalazi jer se pričvrsti na peraje ili škrge ribe.

Rakušci (red Amphipoda) predstavljaju makroskopske rakove iz razreda Malacostraca (potkoljeno Crustacea, koljeno Arthropoda) i čine vrlo bitan dio faune vodenih staništa čitave Europe, pa tako i Hrvatske. Vrlo mali dio vrsta nastanjuje kopnene ekosustave (Vainola i sur. 2008). Za većinu vrsta iz reda je karakteristično bočno spljošteno tijelo. Imaju složene sesilne oči, nemaju karpaks, a prijelaz između prsnog i začanog dijela tijela nije jasan. Njihov usni aparat je dobro razvijen i uključuje maksile i maksilipeđe za hranjenje i za struganje biofilma, te maksile za trganje i žvakanje hrane. Jaja nose u ventralnom marsupiju, a juvenilne jedinke se razvijaju od 1 do preko 20 tjedana, ovisno o vrsti i temperaturi vode. Nemaju stadij ličinke. Slatkovodni rakušci pokazuju seksualni dimorfizam koji se očituje u većem tijelu mužjaka od ženki, dok je kod roda *Crangonyx* obrnuto. Tijelo odrasle jedinke slatkovodnih vrsta je obično u rasponu od 4 do 20 mm, a mnogo veći primjerci nađeni su u Bajkalskom jezeru. Njihovo ime se odnosi na dva tipa nogu koje se nalaze na obje strane tijela, a zovu se pereopodi i pleopodi. Pereopodi su grabežljive i duge noge te služe za hodanje i hranjenje te su smještene na prednjem dijelu tijela, a pleopodi su kratke noge na stražnjem dijelu tijela i one služe za plivanje. Jedinstveni su po tome što imaju tri para uropoda koji im služe za guranje u akvatičkim vrsta ili za skakanje u semiterestričkih i terestričkih vrsta. Vrlo su brojni u zajednicama dna potoka i rijeka, a njihova funkcionalna uloga u hranidbenoj strukturi vodenih staništa je usitnjavanje krupnog organskog detritusa (Glazier 2009) te su važni u protoku energije i kruženju tvari u kopnenim vodama.

6.1. Problemi pri uzorkovanju beskralješnjaka u nekim površinskim kopnenim vodama u okviru preliminarnog monitoringa tijekom 2017. godine

Na svih 18 odabranih mjernih postaja uzorkovane su ribe, dok je školjkaše bilo moguće uzorkovati samo na 6 postaja. S obzirom na njihovu specifičnu ekologiju, a time i staništa

na kojima obitavaju, školjkaše je moguće uzorkovati samo na lokacijama za koja su karakteristična pjeskovita dna. Uz to, njihovo uzorkovanje je otežano i zbog činjenice što su uglavnom ukopani u pijesak te je potreban povećan napor da se uzorkuje dovoljan broj jedinki. Upravo je zbog navedenog provedeno uzorkovanje i druge skupine beskralješnjaka, rakušaca, na dodatnih 7 postaja kako bi ispitali njihovu primjenu kao indikatorskih organizama za mjerenje fluorantena i benzo(a)pirena. Međutim, i rakušce možemo naći samo u čistim vodama bogatim kisikom te je također ograničen broj staništa na kojima ih možemo uzorkovati. Poznato je da su obje skupine, i školjkaši i rakušci osjetljivi na zagađenje te upravo staništa koja su pod jačim antropogenim utjecajem nisu prikladna za njihovo uzorkovanje. Osim toga, jedinke rakušaca su vrlo sitne i javlja se problem prikupljanja dovoljne količine uzoraka za analize. Načelno, rakušci su se pokazali prikladnim organizmom za određivanje akumulacije PAH-ova u bioti, ali treba napomenuti da je provedba monitoringa otežana iz gore navedenih razloga. Mogla bi se također ispitati primjena alternativnih indikatorskih organizama iz skupine beskralješnjaka, npr. slatkovodnih puževeva iz porodice Lymnaeidae, koji su se u švedskoj studiji iz 2015. godine pokazali pogodni za monitoring PAH-ova (Karlsson et al., 2015).

7. ZAKLJUČAK

U opisanoj metodologiji za provođenje monitoringa elemenata kemijskog stanja u bioti površinskih kopnenih voda navedene su preporuke za izbor indikatorskih organizama i provođenje metodologije uzorkovanja vodenih organizama za analizu prioritarnih tvari u skladu s Okvirnom direktivom o vodama Europske unije 2013/39/EU (EU, 2013). Predstavljani su ciljevi i namjena ocjene kemijskog stanja voda na osnovu mjerenja koncentracija prioritarnih tvari u bioti, kao i izbor organizama, njihova ugroženost, zaštita i ekologija u pojedinim kopnenim površinskim vodama Republike Hrvatske.

Izbor vrste organizama u kojima se provode analize prioritarnih tvari temelji se na činjenici da je većina od 11 prioritarnih tvari za koje su definirane SKVO za biotu podložna biomagnifikaciji te se one analiziraju u ribama, kao organizmima na višem trofičkom nivou. Izuzetak su PAH-ovi (poliaromatski ugljikovodici), poput fluorantena i benzo(a)pirena, koji se određuju u beskralješnjacima, odnosno u organizmima na nižem trofičkom nivou (rakovi ili školjkaši). Analiza u ribama predviđena je u dvije različite vrste tkiva, ovisno radi li se o zaštiti od sekundarnog trovanja (cijela riba) ili zaštiti ljudskog zdravlja (mišićno tkivo ribe) te se heksaklorobutadien, živa i njezini spojevi, dikofol i heksabromociklododekan mjere u cijeloj ribi, a bromirani difenileteri, heksaklorbenzen, perfluoroktansulfonska kiselina, dioksini i spojevi poput dioksina, heptaklor i heptakloreperoksid se mjere u mišiću ribe.

U preporukama za provođenja monitoringa biote navedene su i smjernice za osmišljavanje programa uzorkovanja, odabira vrste monitoringa (pasivni ili aktivni biomonitoring) te obrade i prikaza rezultata, uključujući normalizaciju na sadržaj masti i suhe tvari te utjecaj trofičkog nivoa na ocjenu sukladnosti sa $SKVO_{biota}$. Poželjno je mjeriti koncentracije prioritarnih tvari u ribama koje su na $TL = 3,5 - 4,5$ za koje su definirani $SKVO_{biota}$.

Preporuča se za korištene vrste riba prikupiti podatke o trofičkom nivou na kojem se nalaze, ili iz dostupnih baza podataka (FishBaze), ili, što bi bilo poželjnije, koristiti konkretne podatke za te vrste riba. Međutim, sukladno dostupnoj literaturi, ne preporuča se korekcija izmjerenih koncentracija na standardni trofički nivo, jer to može uvesti velike pogreške prilikom ocjene sukladnosti izmjerenih koncentracija sa SKVO_{biota}.

U skladu s preporukama Europske direktive o vodama (EC, 2014a) predložene su vrste riba i beskralježnjaka koje su prikladne za provođenje monitoringa elemenata kemijskog stanja u bioti površinskih kopnenih voda, imajući u vidu da su to reprezentativne vrste za pojedino vodno tijelo, da treba obuhvatiti što manji broj vrsta kako bi se omogućila bolja usporedivost rezultata iz različitih vodnih tijela te uzeti u obzir njihovu ugroženost, zaštitu i ekologiju te važnost za prehranu ljudi. Navedena je potrebna veličina i starost organizama te postupak uzorkovanja i pripreme za analizu prioritarnih tvari.

Navedena metodologija za provođenje monitoringa elemenata kemijskog stanja u bioti površinskih kopnenih voda predstavlja prijedlog na temelju dosadašnjih saznanja o reprezentativnim vrstama i njihovoj ekologiji u pojedinim vodnim tijelima. Moguće je da će prijedlog ove metodologije u dijelu koji se odnosi na izbor vrsta organizama biti potrebno nadopunjavati/korigirati nakon daljnje provedbe monitoringa biote na većem broju vodnih tijela površinskih kopnenih voda.

8. LITERATURA

- Bauer G (2001) Characterization of the Unionoida (= Naiads). Ecology and evolution of the freshwater mussels. Unionoida 145, 3–4
- Cossa D, Harmelin-Civien M, Mellon-Duval C, Loizeau V, Averty B, Crochet S, Chou L, Cadiou JF (2012) Influences of Bioavailability, Trophic Position, and Growth on Methylmercury in Hakes (*Merluccius merluccius*) from North-western Mediterranean and North-eastern Atlantic. Environmental Science & Technology 46, 4885–4893
- Cuttelod A, Seddon M, Neubert E (2011) European Red list of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Duplić A (2008) Slatkovodne ribe. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 2008
- EC 2000, Direktiva 2000/60/EC Europskog Parlamenta i Vijeća kojom se uspostavlja okvir za djelovanje Zajednice na području politike voda (Okvirna direktiva EU o vodama)
- EC 2008, Direktiva 2008/105/EC Europskog parlamenta i Vijeća o standardima kvalitete okoliša u području vodne politike
- EC 2011, CIS zu ODV, Upute br. 27. Tehnička uputa za uspostavljanje standarda kakvoće okoliša unutar Okvirne direktive o vodama.

- EC 2014a, CIS za ODV, Upute br. 32. Uputa za monitoring biote unutar Okvirne direktive o vodama
- EC 2014b, CIS za ODV, Upute br. 33. Uputa za analitičke metode za monitoring biote unutar Okvirne direktive o vodama
- EFSA 2009, Guidance Document on Risk Assessment of Birds and Mammals. Parma, Italy: European Food Safety Authority (EFSA), 358
- Eljarrat E, Bareclo D (2018) How do measured PBDE and HCB levels in river fish compare to the European Environmental Quality Standards? *Environmental Research* 160, 203-211
- EU 2013, Direktiva 2013/39/EU Europskog parlamenta i Vijeća o izmjeni direktiva 2000/60/EZ i 2008/105/EZ u odnosu na prioritetne tvari u području vodne politike
- FAME Consortium (2004) Manual for the application of the European Fish Index – EFI. A fish-based method to assess the ecological status of European rivers in support of the Water Framework Directive. Version 1.1, January 2005
- Glazier DS (2009) Amphipoda. U: Likens GE (ur.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Oxford, Elsevier, vol. 2, 89-115
- HELCOM, 2017. Core indicator report, Polybrominated diphenyl ethers (PBDE), July 2017.
- <http://www.fishbase.org/search.php>
- ISO, 2011, ISO 5667-23:2011, Water quality — Sampling — Part 23: Guidance on passive sampling in surface waters.
- Karlsson M (2015) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater snails of family Lymanidae from Patholmsviken. Project in Chemistry: 15 HP, Oerebro University, 68.
- Killeen I, Aldridge D, Oliver G (2004) *Freshwater Bivalves of Britain and Ireland*. FSC, AIDGAP Occasional Publication, 82.
- Kottelat M, Freyhof J (1972) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 646
- Matoničkin I, Habdija I, Primc Habdija B (1998) Beskralješnjaci – biologija nižih avertabrata. Školska knjiga, Zagreb, 593-620
- Mrakovčić M, Brigić A, Buj I, Čaleta M, Mustafić P, Zanella D, 2006 *Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske*. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb, 2006
- Narodne novine, 73/13: Uredbe o standardu kakvoće voda

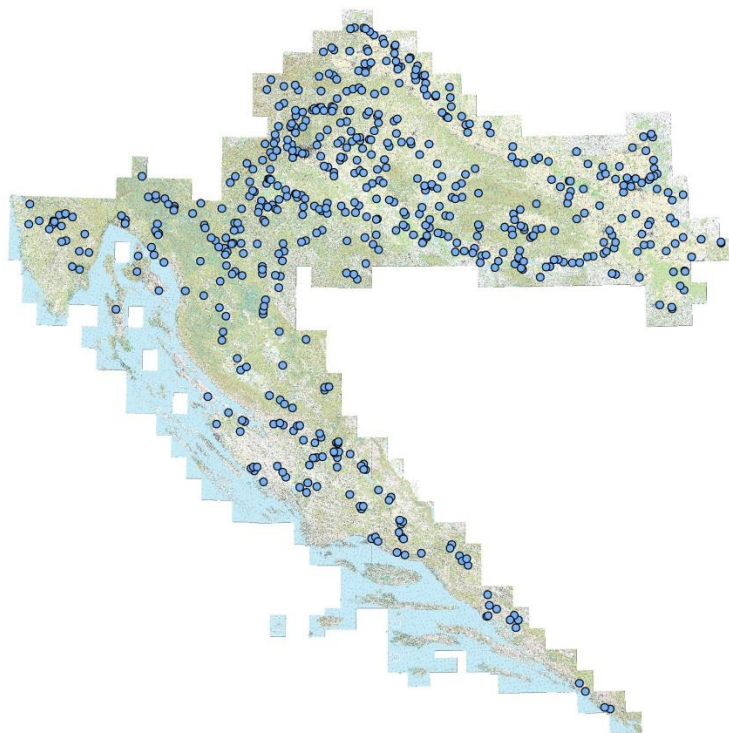
- Narodne novine, 151/14: Uredba o izmjenama i dopunama Uredbe o standardu kakvoće voda
- Narodne novine, 78/15: Uredba o izmjenama i dopunama Uredbe o standardu kakvoće voda
- Narodne novine, 61/16: Uredba o izmjenama i dopunama Uredbe o standardu kakvoće voda
- OSPAR komisija (2016) Mercury assessment in the marine environment. Assessment criteria comparison (EAC/EQS) for mercury.
- Rätz H-J, Lloret J (2003) Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. Fisheries Research 60, 369–380
- Smedes F, Bakker D, de Weert J (2010) The use of passive sampling in WFD monitoring. Deltares, 2010.
- Smedes F, Booij K (2012) Guidelines for passive sampling of hydrophobic contaminants in water using silicone rubber samplers. ICES techniques in marine Environmental Sciences, No. 52
- Väinölä R, Witt JDS, Grabowski M, Bradbury JH, Jazdzewski K, Sket B (2008) Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. Freshwater animal diversity assessment. Hydrobiologia 595, 241-255
- Vignati DAL, Polesello S, Bettinetti R, Bank MS (2013) Mercury environmental quality standard for biota in Europe: Opportunities and challenges. Integrated Environmental Assessment and Management 9, 167-168
- Živković I, Šolić M, Kotnik J, Žižek S, Horvat M (2017). The abundance and speciation of mercury in the Adriatic plankton, bivalves and fish – a review. Acta Adriatica 58(3), 391-420

9. PRILOZI

Prilog 9.1. Naputak za uzorkovanje i pripremu uzoraka riba za provođenje monitoringa u površinskim kopnenim vodama

9.1.1. Vrsta riba, preporučena dužina i starost te period uzorkovanja

Reprezentativne vrste riba za sva vodna tijela rijeka površine sliva veće od 10 km² i jezera površine veće od 0,5 km² u Republici Hrvatskoj prikazane su na karti Republike Hrvatske koja je priređena u HRTS96 projekciji (Slika 9.1.1.1.).



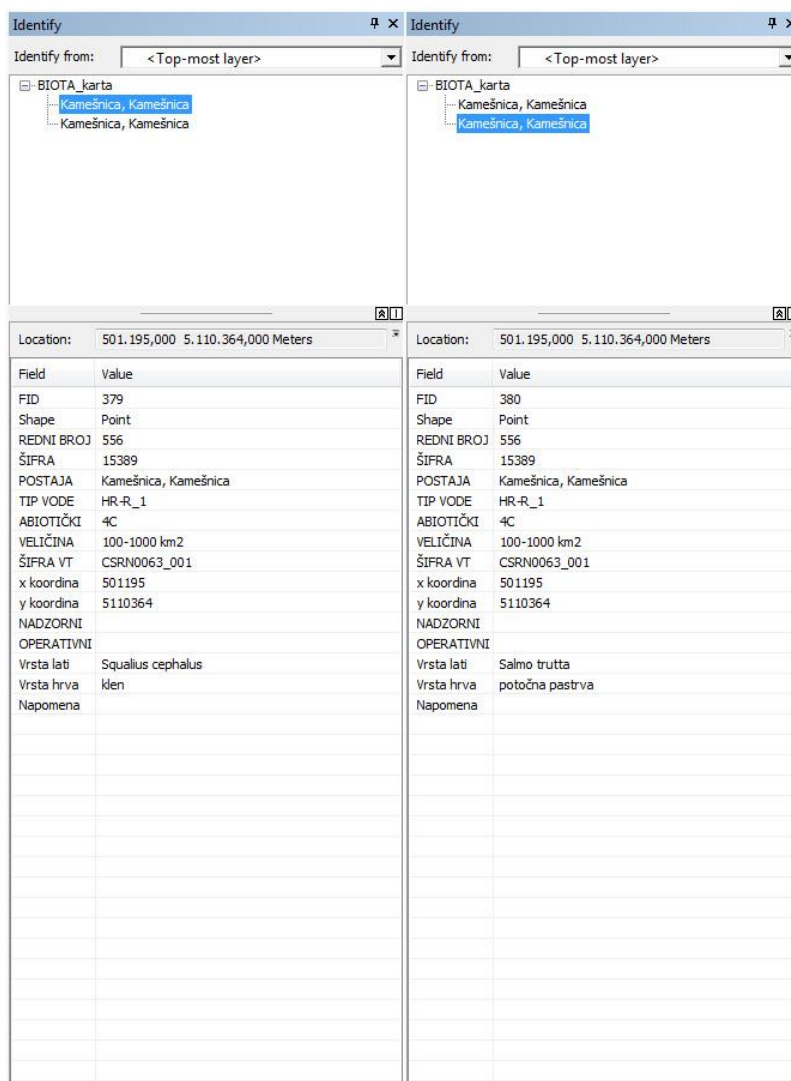
Slika 9.1.1.1. Karta u HRTS96 projekciji s upisanim lokacijama na kojima su predložene reprezentativne vrste riba za sva vodna tijela rijeka površine sliva veće od 10 km² i jezera površine veće od 0,5 km² u Republici Hrvatskoj

Svaka označena postaja na karti predstavlja stanje na odsječku rijeke koji, prema površini porječja iznad točke uzorkovanja iznosi:

- 1 km za male rijeke (porječje < 100 km²),
- 5 km za rijeke srednje veličine (100 – 1000 km²) i
- 10 km za velike rijeke (porječje > 1000 km²) (FAME, 2004).

To znači da se na maloj rijeci odsječkom smatra 500 m uzvodno i 500 m nizvodno od mjesta uzorkovanja, odnosno da se ne očekuje značajnije odstupanje u sastavu ihtiofaune unutar tog kilometra rijeke. Analogno tome, na srednje velikim i velikim rijekama ne očekuje se značajnije odstupanje u sastavu ihtiofaune 2,5 km, odnosno 5 km uzvodno i nizvodno od mjesta uzorkovanja.

Izborom pojedine postaje na karti, otvara se preglednik u kojem se vide reprezentativne vrste riba za pojedinu lokaciju (Slika 9.1.1.2.).



Slika 9.1.1.2. Izgled preglednika za pojedinu lokaciju na karti u HRTS96 projekciji na kojoj su predložene reprezentativne vrste riba za sva vodna tijela rijeka površine sliva veće od 10 km² i jezera površine veće od 0,5 km² u Republici Hrvatskoj

Vrste riba za analizu potrebno je uzorkovati u skladu s Tablicom 5.1. *Odabrane vrste riba, dob, dužina, vrijeme uzorkovanja te period mrijesta* te se maksimalno treba približiti zadanim graničnim vrijednostima navedenima u Tablici 5.1. Ukoliko to nije moguće, zbog nepostojanja neke od navedenih vrsta, tada na licu mjesta treba procijeniti sastav zajednice riba te odlučiti koja vrsta u konkretnom uzorku približno zadovoljava značajkama odabranih vrsta u tablici.

9.1.2. Način uzorkovanja riba

Elektroribolov predstavlja univerzalnu standardnu metodu uzorkovanja na rijekama. Ova metoda uzorkovanja omogućuje najbolju procjenu gustoće populacija, bogatstva vrsta i međusobnih odnosa zabilježenih vrsta riba, a predstavlja ujedno i najmanje štetan način ribolova u usporedbi s drugim metodama.

Za potrebe ove studije elektroagregatom je lovljeno s obale ili iz čamca. Na većim rijekama gdje je zbog dubine ($>0,7$ m) i raznolikosti staništa nemoguće obaviti kvalitetno uzorkovanje s obale ni hodanjem po rijeci, korišten je poseban čamac za elektroribolov. U dubljim vodama elektroribolov nije toliko efikasna metoda jer ribe imaju veću mogućnost izbjegavanja električnog polja. U spomenutim slučajevima elektroagregat mora imati veću snagu (preporuča se najmanje 2,5 kW za lov s obale i najmanje 5 kW za lov iz čamca) i mora omogućavati lov pulsirajućom strujom. Nužno je koristiti istosmjernu struju (sa ili bez mogućnosti pulsiranja) jer je najmanje štetna za ribe, a daje najbolje rezultate dok se izmjenična struja ne koristi. Primjerice, u ovom istraživanju korišten je ribolovni elektroagregat snage 7,5 kW na svim postajama osim na postajama na rijekama Savi i Dunavu, gdje je, zbog veličine samog vodotoka, korišten ribolovni elektroagregat snage 11 kW. Lovljeno je jednom anodom promjera obruča od 50 cm na dršku od stakloplastike dužine 2,5 m iz gumenog čamca prilagođenog za elektroribolov ili hodajući uz obalu ako je dubina vodotoka bila manja od 70 cm. Na vrlo velikim rijekama (Savi i Dunavu) koristi se sistem od četiri anode koje vise s vrha izbočene konstrukcije i zatvaraju električno polje širine 2 m, a dva istraživača su sakupljala ošamućenu ribu i dostavljali ju dijelu tima na brojanje i determinaciju. Ribolov se obavljao nizvodno kretanjem čamca uzduž obale na način da su u najvećoj mjeri pokrivena sva postojeća staništa, a posebno mjesta gdje se ribe mogu sakriti. Kada se sakupi dovoljno uzoraka, riba se sprema na hladno i prosljeđuje na daljnju analizu.

9.1.3. Obrada i priprema uzoraka riba za analizu

Vrsta i količina tkiva riba koja je potrebna za analizu prioritarnih tvari u ribama definirani su ciljevima zaštite za te prioritarnne tvari, zadanim vrijednostima $SKVO_{biota}$, te osjetljivošću analitičkih metoda koje se koriste. Od 9 prioritarnih tvari koje se analiziraju u ribama, uzimajući u obzir različite ciljeve zaštite, 5 se analiziraju u mišiću ribe (cilj - zaštita ljudskog zdravlja), a 4 u cijeloj ribi (cilj - zaštita od sekundarnog trovanja) (Tablica 2.2.). Minimalne odvage mokre mase mišića i cijele ribe koje su potrebne za analizu pojedinih prioritarnih tvari navedene su u Tablici 9.1.3.1. Za analizu svih prioritarnih tvari

koje se određuju u ribama potrebno je minimalno 300 g mokre mase mišića riba (ili 1000 g cijele ribe prije uklanjanja mišića) i 200 g mokre težine cijele ribe, dakle ukupno 1200 g mokre težine riba za analizu svih 9 prioriternih tvari. Treba napomenuti da analitička metoda koja se koristi značajno utječe na količinu tvari koja je potrebna za analizu, tako da se količine tkiva potrebne za analizu trebaju uskladiti sa zahtjevima analitičkih metoda koje se koriste za provođenje svakog monitoringa.

Rukovanje s uzorcima riba obavlja se u zaštitnim, plastičnim rukavicama kako bi se spriječila kontaminacija. Nakon uzorkovanja ribe je potrebno odmah zamrznuti te pohraniti u plastičnim vrećicama na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do obrade u laboratoriju. Prije obrade svakoj ribi treba odrediti ukupnu dužinu i masu, kako bi se mogla procijeniti njihova starost i kondicijski indeks. Odvajanje mišića iz uzorka cijele ribe treba provesti na poluodmrznutim uzorcima, kako bi se izbjeglo kompletno otapanje tkiva i eventualno zagađenje mišića utrobnim organima ribe. Mišiće je potrebno odvojiti od ostatka tijela ribe (glava, ljuske, koža i utrobni organi) te za dovoljnu odvag u spojiti i homogenizirati mišiće većeg broja riba. Za analizu cijele ribe potreban broj jedinki riba za analizu se spoje u zajednički uzorak i homogeniziraju.

Vrijednosti za $SKVO_{\text{biota}}$ su izražene na mokru težinu, tako da je potrebno izmjerene vrijednosti izraziti na mokru težinu uzorka. Međutim zbog lakšeg transporta uzoraka do mjesta analize, preporuča se da se nakon homogenizacije uzorci liofiliziraju. Za svaki uzorak mora se odrediti suha masa kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru masu i napraviti ocjena sukladnosti sa $SKVO_{\text{biota}}$. Liofilizirane uzorke potrebno je čuvati na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

Faktor preračuna s mokre na suhu masu za cijelu ribu je oko 4 (tkivo riba sadrži prosječno 25 % suhe tvari), a za mišićno tkivo riba 5 (mišićno tkivo sadrži prosječno 20 % suhe tvari), tako da je nakon liofiliziranja potrebno ukupno za sve analize oko 60 g suhe mase za mišić i 50 g suhe mase za cijelu ribu.

Tablica 9.1.3.1. Količina uzorka potrebna za analizu pojedinih prioriternih tvari u cijelim ribama i u mišiću riba (podaci iz preliminarnog monitoringa provedenog 2017./2018. godine).

Prioritetna tvar	Masa mokrog uzorka potrebna za analizu
Analize koje se rade u mišiću riba (cilj zaštita ljudskog zdravlja)	
Bromirani difenileteri	100 g
Heksaklorbenzen Heptaklor i heptaklorepoksid	30 g
PFOS	30 g
Dioksini	100 g
Ukupno za analizu tvari u mišiću riba	300 g (1000 g neočišćene ribe)
Analize koje se rade u cijeloj ribi (cilj zaštita od sekundarnog trovanja)	
Hg	30 g
HBCDD	30 g
Heksaklorobutadien	30 g
Dikofol	100 g
Ukupno za analizu tvari u cijeloj ribi	200 g

Analitičke metode koje se koriste za analizu prioriternih tvari opisane su u preporukama Europske komisije za analizu prioriternih tvari br. 33 (EC, 2014 b). Općenito se postupak za određivanje organskih prioriternih tvari sastoji od ekstrakcije organskim otapalom, čišćenja, frakcioniranja, odvajanja kromatografskim tehnikama (plinskom ili tekućinskom kromatografijom, ovisno o vrsti spoja) i detekciji masenom spektrometrijom. Koncentracija žive u ribama određuje se tehnikom atomske spektroskopije hladnih para nakon razgradnje uzorka mineralnim kiselinama. Analitičke metode koje se koriste moraju biti validirane i moraju ispunjavaju minimalne kriterije učinkovitosti, a pod tim se podrazumijeva da se analize temelje na mjernoj nesigurnosti od 50 % ili manje ($k = 2$), procijenjenoj na razini relevantnih standarda kvalitete okoliša, i granici kvantifikacije jednakoj ili manjoj od 30 % relevantnih standarda kvalitete okoliša.

Prilog 9. 2. Naputak za uzorkovanje i pripremu uzoraka beskralješnjaka za provođenje monitoringa u površinskim kopnenim vodama

Dvije od 11 prioriternih tvari za koje su definirane vrijednosti $SKVO_{biota}$, fluoranten i benzo(a)piren, potrebno je analizirati u beskralješnjacima, odnosno školjkašima ili rakovima.

9.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka školjkaša

Potrebno je sakupiti 5-10 jedinki školjkaša u rasponu dužine 5-10 cm (Tablica 9.2.1.1.) i pohraniti ih u plastičnu vrećicu. Ako se uzorci školjkaša čiste unutar 24 sata od uzorkovanja čuvaju se na hladnom mjestu na 4 °C. Ako je period prije obrade duži, školjkaše je potrebno odmah nakon uzorkovanja zamrznuti i do obrade čuvati na temperaturi od -20 °C. Prije obrade potrebno je izmjeriti dužinu i masu školjkaša te zatim odvojeno masu školjke i masu mekog tkiva kako bi se mogao odrediti indeks kondicije i mokra masa za analize. Za analizu se koriste ukupna meka tkiva. Cijelo meko tkivo 5-10 jedinki školjkaša (odvaga mokre mase tkiva mora biti oko 30-50 g) se homogenizira i liofilizira. Liofilizirane uzorke potrebno je čuvati na temperaturi od -20 °C. Za svaki uzorak potrebno je odrediti suhu masu, kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru težinu i ocijeniti usklađenost sa SKVO_{biota}.

Faktor preračuna s mokre na suhu masu za školjkaše je oko 10 (tkivo sadrži prosječno 10 % suhe tvari), tako da se nakon liofiliziranja dobije oko 3-5 g suhe mase jedinki školjkaša za analizu PAH-ova.

Tablica 9.2.1.1. Preporučena vrsta školjaka za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučeni period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

Vrsta školjaka	Potreban broj jedinki	Dužina /cm	Period uzorkovanja	Potrebna masa mokrog tkiva /g
Vrste iz porodice Unionidae	5-10	6-10	po izbacivanju vlastitih glohidija	30-50

Analitičke metode koje se koriste za analizu prioriternih tvari opisane su u preporukama Europske komisije za analizu prioriternih tvari broj 33 (EC, 2014 b). Postupak za određivanje PAH-ova sastoji se od ekstrakcije organskim otapalom, čišćenja, frakcioniranja, razdvajanja plinskom kromatografijom i detekcije masenom spektrometrijom. Analitičke metode koje se koriste moraju biti validirane i moraju ispunjavati minimalne kriterije učinkovitosti, a pod tim se podrazumijeva da se analize temelje na mjernoj nesigurnosti od 50 % ili manje ($k = 2$), procijenjenoj na razini relevantnih standarda kvalitete okoliša, i granici kvantifikacije jednakoj ili manjoj od 30 % relevantnih standarda kvalitete okoliša.

9.2.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka rakušaca

Potrebno je sakupiti oko 400-700 jedinki rakušaca čija je ukupna mokra masa oko 10-20 g i pohraniti ih u plastičnu vrećicu. Rakušce je potrebno odmah nakon uzorkovanja zamrznuti i do obrade čuvati na temperaturi od -20 °C. Prije obrade potrebno je izmjeriti točnu masu rakušaca kako bi se odredila mokra masa uzorka za analize. Za analizu se koriste cijele jedinke rakušaca (uzima se onoliko jedinki da se dobije odvaga od oko 10-20

g) koje se stavljaju u posudicu i liofiliziraju. Nakon liofilizacije, uzorke je potrebno čuvati na temperaturi od -20 °C. Za svaki uzorak potrebno je odrediti suhu masu, kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru težinu i ocijeniti usklađenost sa SKVO_{biota}.

Faktor preračuna s mokre na suhu masu za rakušce je oko 4 (tkivo sadrži prosječno 25 % suhe tvari), tako da se nakon liofiliziranja dobije oko 3-5 g suhe mase jedinki rakušaca za analizu PAH-ova.

Tablica 9.2.2.1. Preporučena vrsta rakušaca za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučeni period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

Vrsta rakušaca	Potreban broj jedinki	Dužina /cm	Period uzorkovanja	Potrebna masa mokrog tkiva /g
Vrste iz porodice Gammaridae	400-700	0,5-1	Pristuni tijekom cijele godine, posebno jesen-zima kad je puno listinca u vodotocima	10-20