



REZULTATI PROVEDBE PRELIMINARNOG 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**



NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO

**Prvomajska ulica 1
2000 Maribor
Slovenija**



REZULTATI PROVEDBE PRELIMINARNOG MONITORINGA PRIORITETNIH TVARI U BIOTI POVRŠINSKIH KOPNENIH VODA

Voditelj studije:

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

Za konzorcij:

**Ravnatelj
Institut Ruder Bošković**

Dr. sc. David Matthew Smith

Zagreb, rujan 2018.

Suradnici na projektu:

IME I PREZIME	INSTITUCIJA
Vlatka Filipović Marijić	ZAVOD ZA ISTRAŽIVANJE MORA I OKOLIŠA, INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB
Marijana Erk	
Zrinka Dragun	
Dušica Ivanković	
Nesrete Krasnići	
Tatjana Mijošek	
Nevenka Mikac	
Martina Furdek Turk	
Maja Ivanić	
Marijan Ahel	
Petar Ujčić	
Iva Mikac	
Nenad Muhin	
Ivan Senta	
Ivona Krizman	
Senka Terzić	
Vlado Cuculić	
Perica Mustafić	BIOLOŠKI ODSJEK PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKOG FAKULTETA SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
Milorad Mrakovčić	
Davor Zanella	
Zoran Marčić	
Ivana Buj	
Sven Horvatić	
Siniša Vajdić	
Marko Čaleta	
Roman Karlović	
Jasna Lajtner	
Mojca Baskar	NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO, MARIBOR
Boštjan Križanec	
Darinka Štajnbaher	
Ernest Vončina	

SADRŽAJ

POJMOVNIK STRUČNIH IZRAZA I KRATICA	1
1. UVOD	2
1.1. Uvodne napomene	2
1.2. Kalendari uzorkovanja	3
1.2.1. Uzorkovanja na odabranim mjernim postajama u okviru preliminarnog monitoringa	3
1.2.2. Uzorkovanja na dodatnim mjernim postajama u okviru preliminarnog monitoringa	4
1.3. Postupci uzorkovanja biote	4
1.3.1. Uzorkovanje riba	4
1.3.2. Uzorkovanje školjkaša	6
1.3.3. Uzorkovanje rakušaca	6
1.4. Postupci pripreme uzoraka biote za analize prioritetnih tvari	7
1.4.1. Postupci pripreme uzoraka riba za analize prioritetnih tvari	7
1.4.2. Postupci pripreme uzoraka školjkaša za analize prioritetnih tvari	13
1.4.3. Postupci pripreme uzoraka rakušaca za analize prioritetnih tvari	15
1.5. Analize prioritetnih tvari u uzorcima biote	17
1.5.1. Priprema i mjerenje ukupne Hg u tkivu riba	17
1.5.2. Određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) u školjkašima i rakušcima	18
1.5.3. Određivanje organoklorovih pesticida heksaklorbenzena, heptaklora i heptaklorepoksida u mišiću riba	19
1.5.4. Određivanje polibromiranih difeniletera (PBDE) u mišiću riba	20
1.5.5. Određivanje heksaklorobutadiena (HCB) i heksabromociklododekana (HBCDD) u cijeloj ribi	20
1.5.6. Određivanje perfluorooktansulfonske kiseline (PFOS) u mišiću riba	21
1.5.7. Određivanje dikofola u mišiću riba	22
1.5.8. Određivanje dioksina i njima sličnih spojeva u mišiću riba	22
2. REZULTATI	24
2.1. Uvodne napomene	24
2.2. Koncentracije prioritetnih tvari u bioti površinskih kopnenih voda	24
2.2.1. Koncentracija ukupne Hg u cijeloj ribi	28
2.2.2. Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) u školjkašima i rakušcima površinskih kopnenih voda	33
2.2.3. Organoklorovi pesticidi u bioti površinskih kopnenih voda	35
2.2.4. Dioksini i njima slični spojevi u bioti površinskih kopnenih voda	36
2.2.5. Heksaklorobutadien (HCB) u bioti površinskih kopnenih voda	37
2.2.6. Polibromirani usporivači gorenja u bioti površinskih kopnenih voda	37

2.2.7. Perfluorooktansulfonska kiselina (PFOS) u bioti površinskih kopnenih voda	40
2.2.8. Napomene o utjecaju izbora vrste organizama i njihovih biometrijskih podataka na monitoring organskih prioriternih tvari u bioti	41
3. RASPRAVA	45
3.1. Ocjena kemijskog stanja površinskih kopnenih voda obuhvaćenih u preliminarnom monitoringu tijekom 2017. godine	45
4. ZAKLJUČCI I PREPORUKE	47
5. LITERATURA	48

POJMOVNIK STRUČNIH IZRAZA I KRATICA

ASE – uređaj za ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju (engl. Accelerated Solvent Extraction)
BaP – benzo(a)piren
CV-AAS – atomska apsorpcijska spektrometrija hladnih para (engl. cold vapour atomic absorption spectrometry)
ECD – detektor zahvata elektrona
Flu – fluoranten
GC-MS – vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa
H₂SO₄ – sumporna kiselina
HBCDD – heksabromociklododekan
HC – heptaklor
HCB – heksaklorbenzen
HCBD – heksaklorbutadien
HCE – heptaklorepoksid
HClO₄ – perklorna kiselina
Hg – živa
HNO₃ – dušična kiselina
HpC – heptaklorepoksid
HRGC/HRMS – vezani sustav plinske kromatografije visoke razlučivosti i spektrometrije masa visoke razlučivosti
LC-MS/MS – vezani sustav tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa
MeHg – metil-živa
m.t. – mokra težina
PAH – poliaromatki ugljikovodici
PBDE – polibromirani difenil-eteri
PCB – poliklorirani bifenili
PCDF – poliklorirani dibenzofurani
PFOA – perfluoroktanska kiselina
PFOS – perfluorooktansulfonska kiselina
SKVO – standard kakvoće okoliša
SKVO_{biota} – standard kakvoće okoliša za biotu
SnCl₂ – kositrov(II) klorid
s.t. – suha težina
TE – toksični ekvivalent
TL – trofički nivo (engl. trophical level)
ε-HCH – heksaklorcikloheksan

1. UVOD

1.1. Uvodne napomene

Standardi kakvoće vodenog okoliša (SKVO) za biotu doneseni su s ciljem zaštite slatkovodnih i morskih ekosustava od neželjenih učinaka koje štetne tvari mogu imati na vodene organizme, a posredno i na čovjeka putem prehrane vodenim organizmima. 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 prioritete tvari u području vodne politike, propisani SKVO za biotu definirani su za živu (Hg), heksaklorbenzen (HCB), heksaklorbutadien (HCBD), fluoranten (Flu), poliaromatske ugljikovodike (PAH), polibromirane difeniletere (PBDE), dikofol, perfluorooktan sulfonsku kiselinu (PFOS) i njezine derivate, dioksine i spojeve poput dioksina, heksabromociklododekan (HBCDD) te heptaklor i heptaklorepoksid. Propisani SKVO odnose se na ribu, osim u slučaju PAH-ova i fluorantena, čiji standardi se odnose na beskralješnjake (rakove i mekušce).

U svrhu razvoja usklađene strategije monitoringa voda u okviru Okvirne direktive o vodama (EC, 2000), 2014. godine objavljen je Dokument Europske komisije br. 32 „O monitoringu biote (primjena SKVO za biotu) u okviru Europske direktive o vodama“ (EC, 2014), u kojem se navode preporuke za provođenje monitoringa biote u državama članicama Europske unije. Taj dokument prema tome služi kao baza za donošenje metodologije provođenja monitoringa biote u Hrvatskoj. Tvari koje treba ispitivati u bioti propisane su Uredbom o standardu kakvoće voda (NN 73/13, 151/14 i 78/15) te su trenutno u Hrvatskoj definirane SKVO za biotu za 11 spomenutih prioriteta tvari. U ovom su Izvješću prikazani rezultati analize prioriteta tvari u bioti površinskih kopnenih voda na 18 odabranih mjernih postaja u okviru monitoringa kemijskog stanja u bioti površinskih kopnenih voda provedenog tijekom 2017. godine.

U skladu s natječajnom dokumentacijom (2016/S 002-0023717) od 26. listopada 2016. preliminarni monitoring realiziran je u potpunosti i proveden na uzorcima riba sa svih 18 mjernih postaja, dok su benzo(a)piren i fluoranten izmjereni u školjkašima koji su nađeni na 6 od ukupno 18 odabranih mjernih postaja. S obzirom da niti na jednoj od 18 predviđenih postaja nisu nađeni rakušci koji potencijalno mogu biti prikladan organizam za analizu PAH-ova, uzorci rakušaca sakupljeni su na 7 dodatnih postaja kako bi se razvila metodologija analize PAH-ova u rakušcima i utvrdilo koliko su ti organizmi uopće pogodni za analizu tih spojeva. Za ocjenu kemijskog stanja vodnih tijela s obzirom na ustanovljene koncentracije prioriteta tvari i prioriteta opasnih tvari u uzorcima biote korišteni su propisi i granične vrijednosti navedene u Uredbi o izmjenama i dopunama uredbe o standardu kakvoće voda NN 78/15, u kojoj su definirani standardi kakvoće okoliša (SKVO) za biotu. Kalendari provedenih uzorkovanja za pojedine skupine organizama prikazani su u poglavlju 1.2.

1.2. Kalendari uzorkovanja

1.2.1. Uzorkovanja na odabranim mjernim postajama u okviru preliminarnog monitoringa

U tablici 1.2.1.1. navedeni su datumi uzorkovanja riba i školjkaša na 18 odabranih nadzornih mjernih postaja za potrebe provođenja preliminarnog monitoringa prioriternih tvari u bioti površinskih kopnenih voda. Uzorkovanja su provedena od lipnja do listopada 2017., s izuzetkom Prošćanskog jezera gdje je uzorkovanje riba provedeno u ožujku 2017.

Tablica 1.2.1.1. Popis mjernih postaja i datumi uzorkovanja riba i školjkaša na navedenim postajama u svrhu analize prioriternih tvari u bioti površinskih kopnenih voda u okviru preliminarnog monitoringa

R. BR.	ŠIFRA	MJERNA POSTAJA	TIP POVRŠINSKE VODE	VODNO TIJELO	DATUM UZORKOVANJA	
					RIBE	ŠKOLJKAŠI
1.	10005	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	HR-R_5C	CSRI0001_005	18.6.2017.	
2.	10010	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	HR-R_5C	CSRN0001_012	14.7.2017.	
3.	10016	Sava, Jankomir	HR-R_5B	CSRN0001_019	17.7.2017.	
4.	10017	Sava, Drenje-Jesenice	HR-R_5B	CSRI0001_021	12.6.2017.	
5.	10019	Sava, Rugvica	HR-R_5B	CSRN0001_018	4.10.2017.	
6.	12002	Bosut, Apševci	HR-R_3B	CSRN0033_001	5.10.2017.	
7.	15112	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	HR-R_4	CSRN0027_001	8.10.2017.	
8.	19000	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	6.9.2017.	
9.	19001	Plitvička jezera, jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	16.3.2017.	
10.	21030	Akumulacija Borovik	HR-R_2B	CDRN0011_007	14.8.2017.	
11.	21085	Bednja, Mali Bukovec	HR-R_4	CDRN0017_001	29.6.2017.	
12.	29020	Dunav, Ilok - most	HR-R_5D	CDRI0001_001	5.10.2017.	
13.	29141	Drava, Legrad	HR-R_5B	CDRN0002_013	17.10.2017.	
14.	29210	Mura, Goričan	HR-R_5B	CDRI0003_002	19.10.2017.	
15.	30120	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	28.7.2017.	
16.	40111	Cetina, Radmanove Mlinice	HR-R_13	JKRN0002_001	25.7.2017.	
17.	40311	Vransko jezero, motel	HR-J_4	JKLN001	26.7.2017.	
18.	40520	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	25.7.2017.	

Kao što se vidi iz Tablice 1.2.1. školjkaši su uzorkovani samo na 6 od ukupno 18 mjernih postaja jer ostale postaje ne predstavljaju tipična staništa za život školjkaša, dok rakušci nisu nađeni ni na jednoj od odabranih mjernih postaja jer također nisu njihovo tipično stanište.

1.2.2. Uzorkovanja na dodatnim mjernim postajama u okviru preliminarnog monitoringa

Kako bi ispitali mogućnost određivanja benzo(a)pirena i fluorantena i u rakušcima, izabrano je dodatnih 7 postaja na kojima su uzorkovani rakušci (Tablica 1.2.2.1.).

Tablica 1.2.2.1. Popis postaja i datumi uzorkovanja rakušaca na navedenim postajama u svrhu analize benzo(a)pirena i fluorantena u okviru preliminarnog monitoringa prioriternih tvari u bioti površinskih kopnenih voda

R. BR.	MJERNA POSTAJA	DATUM UZORKOVANJA
		RAKUŠCI
1.	rijeka Krka, Skradinski buk	4.12.2017.
2.	Sljeme, Kraljevac	10.12.2017.
3.	Sljeme, Markuševačka Trnava	9.12.2017.
4.	Sljeme, pritok Blizneca	10.12.2017.
5.	Sljeme, Baćun	9.12.2017.
6.	Sljeme, Vidovec	9.12.2017.
7.	Sljeme, Gračanski ribnjak	7.12.2017.

Uzorkovanja rakušaca provedena su na svim postajama u prosincu 2017. godine.

1.3. Postupci uzorkovanja biote

1.3.1. Uzorkovanje riba

Na svim navedenim mjernim postajama ribe su uzorkovane elektroagregatom, ovisno o uvjetima na postaji primijenjen je ledni elektroagregat (Slika 1.3.1.1. a) ili je proveden ribolov iz čamca (Slika 1.3.1.1. b). Uzorkovanje se provodilo s ciljem ulova reprezentativne vrste riba za pojedini tip površinskog vodotoka, pazeći na veličinu i dovoljan broj jedinki koje su preporučene za analize. Nakon ulova je na svakoj postaji točno određena vrsta riba na temelju vanjskih morfoloških značajki, a zatim su jedinke odmah pohranjene na led te tako dopremljene do laboratorija gdje su pohranjene na -20°C do daljnje obrade.



a)



b)

Slika 1.3.1.1. Uzorkovanje riba elektroagregatom primjenom: a) lednog agregata; b) elektroagregata iz čamca

Među 18 mjernih postaja, klen je uzorkovan na 11 postaja, patuljasti somić i bodorka na dvije postaje, jegulja i crvenperka na jednoj, dok je invazivna vrsta babuška bila jedina vrsta koju je bilo moguće uzorkovati u dovoljnom broju jedinki na postaji Bosut, Apševci (Tablica 1.3.1.1.).

Tablica 1.3.1.1. Popis uzorkovanih vrsta riba na 18 odabranih mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	ŠIFRA	MJERNA POSTAJA	VRSTE RIBA
1.	10005	Sava, nizvodno od Slavonskog Broda	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
2.	10010	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
3.	10016	Sava, Jankomir	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
4.	10017	Sava, Drenje-Jesenice	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 175.)
5.	10019	Sava, Rugvica	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
6.	12002	Bosut, Apševci	babuška (<i>Carassius gibelio</i> Bloch, 1782)
7.	15112	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	patuljasti somić (<i>Ameiurus nebulosu</i> Lesueur, 1819)
8.	19000	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
9.	19001	Plitvička jezera, jezero Kozjak	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
10.	21030	Akumulacija Borovik	patuljasti somić (<i>Ameiurus nebulosu</i> Lesueur, 1819)
11.	21085	Bednja, Mali Bukovec	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
12.	29020	Dunav, Ilok - most	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
13.	29141	Drava, Legrad	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 1758)
14.	29210	Mura, Goričan	klen (<i>Squalius cephalus</i> Linnaeus, 175.)
15.	30120	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	bodorka (<i>Rutilus rutilus</i> Linnaeus, 1758)
16.	40111	Cetina, Radmanove Mlinice	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i> Linnaeus, 1758)
17.	40311	Vransko jezero, motel	crvenperka (<i>Scardinius erythrophthalmus</i> Linnaeus, 1758)
18.	40520	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	bodorka (<i>Rutilus rutilus</i> Linnaeus, 1758)

1.3.2. Uzorkovanje školjkaša

Školjkaši su uzorkovani pretraživanjem dna i ručnim skupljanjem dovoljnog broja jedinki za analize benzo(a)pirena i fluorantena. Provedena je determinacija vrsta na temelju vanjskih morfoloških značajki te su jedinke zatim držane na ledu od mjesta uzorkovanja do laboratorija, gdje su pohranjene na -20°C do daljnjih analiza.

Tablica 1.3.2.1. Popis uzorkovanih vrsta školjkaša na 6 mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	ŠIFRA	MJERNA POSTAJA	VRSTE ŠKOLJKAŠA
1.	10005	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	<i>Unio pictorum</i> Linnaeus, 1758
2.	10010	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	<i>Anodonta anatina</i> Linnaeus, 1758
7.	15112	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	<i>Unio pictorum</i> Linnaeus, 1758
10.	21030	Akumulacija Borovik	<i>Unio tumidus</i> Philipsson, 1788
11.	21085	Bednja, Mali Bukovec	<i>Unio pictorum</i> Linnaeus, 1758
18.	40520	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	<i>Unio elongatulus</i> Pfeiffer, 1825

Na svim mjernim postajama uzorkovane su vrste školjkaša iz porodice Unionidae (lisanke), odnosno dvije potporodice, Unioninae i Anodontinae. Najčešća je vrsta slikarska lisanka (*Unio pictorum* Linnaeus, 1758.) koja je uzorkovana na 3 mjerne postaje, dok je *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) uzorkovana samo u rijeci Savi kod Jasenovca (Tablica 1.3.2.1.).

1.3.3. Uzorkovanje rakušaca

Rakušci su uzorkovani Surberovom mrežicom na dodatnim postajama koje predstavljaju njihovo specifično stanište, odnosno u rijeci Krki te šest sljemenskih potoka. Nakon ulova su jedinke odmah pohranjene na led te tako dopremljene do laboratorija gdje su pohranjene na -20°C do daljnje obrade. Jedino je na rijeci Krki bilo moguće točno odrediti vrstu uzorkovanih rakušaca, dok je na sljemenskim potocima uz morfološke karakteristike bilo potrebno provesti i molekularnu determinaciju vrsta kako bi se točno utvrdilo o kojoj se vrsti radi, pa su zato na sljemenskim potocima rakušci determinirani do roda.

Tablica 1.3.3.1. Popis uzorkovanih vrsta rakušaca na 7 dodatno odabranih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RAKUŠACA
1.	rijeka Krka, Skradinski buk	<i>Gammarus balcanicus</i> Schäferna, 1922
2.	Sljeme, Kraljevac	<i>Gammarus sp.</i>
3.	Sljeme, Markuševačka Trnava	<i>Gammarus sp.</i>
4.	Sljeme, pritok Blizneca	<i>Gammarus sp.</i>
5.	Sljeme, Baćun	<i>Gammarus sp.</i>
6.	Sljeme, Vidovec	<i>Gammarus sp.</i>
7.	Sljeme, Gračanski ribnjak	<i>Gammarus sp.</i>

1.4. Postupci pripreme uzoraka biote za analize prioriternih tvari

1.4.1. Postupci pripreme uzoraka riba za analize prioriternih tvari

Dio analiza prioriternih tvari u riba provodi se u mišiću ribe, a dio u cijeloj ribi te se nakon odležavanja potreban broj ulovljenih jedinki riba odvojio za analize u cijeloj ribi, dok se na određenom broju jedinki provelo odvajanje mišića.

Svim jedinkama riba koje su odvojene za analize su uzete i/ili izračunate sljedeće mjere:

- totalna dužina (izmjerena ihtiometrom od početka glave do vrha repne peraje; izražava se u cm) (Slika 1.4.1.1.a);
- masa ribe (izmjerena laboratorijskom vagom; izražava se u g) (Slika 1.4.1.1.b);
- kondicijski indeks (izračunat prema Rätz and Lloret (2003): ukupna masa x totalna dužina⁻³, izražava se u g cm⁻³ x 100).



a)



b)

Slika 1.4.1.1. Uzimanje mjera analiziranih riba: a) totalne dužine ihtiometrom; b) mase ribe laboratorijskom vagom

Srednje vrijednosti navedenih mjera pojedinih vrsta riba na pojedinoj mjernoj postaji navedene su u Tablici 1.4.1.1.

Tablica 1.4.1.1. Broj analiziranih jedinki riba i srednje vrijednosti njihove totalne dužine (cm), mase (g) i kondicijskog indeksa ($\text{g cm}^{-3} \times 100$) na 18 mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RIBA	BROJ ANALIZIRANIH JEDINKI	PROSJEČNA TOTALNA DUŽINA RIBA	PROSJEČNA MASA RIBA	PROSJEČNI KONDICJSKI INDEKS RIBA
				cm	g	$\text{g cm}^{-3} \times 100$
1.	Sava, nizvodno od Slavonskog Broda	klen	12	15,5	44,2	1,2
2.	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	klen	10	18,2	59,7	1,0
3.	Sava, Jankomir	klen	17	15,6	41,6	1,1
4.	Sava, Drenje-Jesenice	klen	6	19,8	100,1	1,2
5.	Sava, Rugvica	klen	36	13,0	23,9	1,1
6.	Bosut, Apševci	babuška	14	11,6	28,6	1,7
7.	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	patuljasti somić	23	14,2	32,7	1,1

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RIBA	BROJ ANALIZIRANIH JEDINKI	PROSJEČNA TOTALNA DUŽINA RIBA	PROSJEČNA MASA RIBA	PROSJEČNI KONDICIJSKI INDEKS RIBA
8.	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	klen	4	28,2	247,8	1,1
9.	Plitvička jezera, jezero Kozjak	klen	7	25,8	170,4	1,0
10.	Akumulacija Borovik	patuljasti somić	26	14,8	42,9	1,3
11.	Bednja, Mali Bukovec	klen	19	13,7	29,7	1,1
12.	Dunav, Ilok - most	klen	13	15,2	38,1	1,0
13.	Drava, Legrad	klen	69	8,5	6,6	1,0
14.	Mura, Goričan	klen	13	15,6	64,1	1,7
15.	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	bodorka	268	6,5	2,8	0,9
16.	Cetina, Radmanove Mlinice	jegulja	7	40,1	132,1	0,2
17.	Vransko jezero, motel	crvenperka	13	19,7	137,9	1,8
18.	Bačinska jezera, Jezero Crniševo	bodorka	68	10,7	14,6	1,2

Broj uzorkovanih jedinki riba prilagođen je preporučenim odvagama cijele ribe, odnosno mišića ribe koji su potrebni za provođenje analiza prioriternih tvari. S obzirom da je veličina (masa) riba značajno varirala ovisno o vrsti i pojedinim postajama, broj jedinki koje je bilo potrebno uzorkovati da bi se dobila dovoljna količina tkiva za sve analize bio je vrlo različit i kretao se u rasponu od 4 do 268 jedinki (Tablica 1.4.1.1.).

Obrada uzoraka za analize u cijeloj ribi uključivala je usitnjavanje cijele ribe na manje komade, koji su zatim stavljeni u posudu štapnog miksera (Gorenje, HBX883QW) te usitnjene do homogene smjese. Obrada uzoraka za analize u mišiću riba obuhvaćala je skidanje ljustica i kože riba te odvajanje čistog mišića skalpelom i škarama, a zatim usitnjavanje mišića štapnim mikserom (Gorenje, HBX883QW) do homogene smjese. Ovako usitnjeni uzorci cijele ribe i mišića prebačeni su u nekoliko prethodno odvaganih posudica za liofilizaciju, pazeći da ne bude previše uzorka po posudici kako bi se uzorak ravnomjerno liofilizirao. Posudice s uzorcima su ponovo izvagane kako bi se odredila točna masa mokrog uzorka cijele riba i mišića te pohranjene na -80°C do liofilizacije.

S obzirom da je za analize prioriternih tvari u cijeloj ribi neophodno preko 200 g mokre mase riba, a za analize u mišiću preko 300 g mokre mase mišića, što predstavlja oko 1000 g cijele slatkovodne ribe, broj uzetih jedinki za pojedine analize prilagođen je ovim odvagama. Tako je broj analiziranih jedinki za određivanje prioriternih tvari u cijeloj ribi na 18 mjernih postaja uzet u rasponu od 2 do 117 jedinki (Tablica 1.4.1.2.), dok je za određivanje prioriternih tvari u mišiću ribe bilo potrebno od 3 do 151 jedinke (Tablica 1.4.1.3.).

Tablica 1.4.1.2. Broj analiziranih jedinki riba i prosječna suha tvar (%) uzorka cijele ribe za analize prioriternih tvari u cijeljoj ribi na 18 mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RIBA	BROJ ANALIZIRANIH JEDINKI	PROSJEČNA SUHA TVAR
				%
1.	Sava, nizvodno od Slavonskog Broda	klen	4	27,2
2.	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	klen	4	25,5
3.	Sava, Jankomir	klen	6	25,1
4.	Sava, Drenje-Jesenice	klen	2	26,8
5.	Sava, Rugvica	klen	11	27,7
6.	Bosut, Apševci	babuška	9	25,2
7.	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	patuljasti somić	7	19,8
8.	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	klen	1	24,3
9.	Plitvička jezera, jezero Kozjak	klen	2	23,6
10.	Akumulacija Borovik	patuljasti somić	6	23,1
11.	Bednja, Mali Bukovec	klen	9	23,1
12.	Dunav, Ilok - most	klen	7	25,2
13.	Drava, Legrad	klen	17	23,7
14.	Mura, Goričan	klen	4	24,1
15.	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	bodorka	117	23,0
16.	Cetina, Radmanove Mlinice	jegulja	2	37,7
17.	Vransko jezero, motel	crvenperka	2	24,5
18.	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	bodorka	17	29,0

Tablica 1.4.1.3. Broj analiziranih jedinki riba i prosječna suha tvar (%) uzorka mišića za analize prioriternih tvari u mišiću riba na 18 mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RIBA	BROJ ANALIZIRANIH JEDINKI	PROSJEČNA SUHA TVAR
				%
1.	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	klen	8	20,6
2.	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	klen	6	20,3
3.	Sava, Jankomir	klen	11	21,3
4.	Sava, Drenje-Jesenice	klen	4	21,1
5.	Sava, Rugvica	klen	25	22,0
6.	Bosut, Apševci	babuška	5	22,1
7.	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	patuljasti somić	16	18,2
8.	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	klen	3	19,1
9.	Plitvička jezera, jezero Kozjak	klen	5	18,6
10.	Akumulacija Borovik	patuljasti somić	20	19,4
11.	Bednja, Mali Bukovec	klen	10	20,3
12.	Dunav, Ilok - most	klen	6	20,7
13.	Drava, Legrad	klen	52	21,5
14.	Mura, Goričan	klen	9	20,4
15.	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	bodorka	151	20,0
16.	Cetina, Radmanove Mlinice	jegulja	5	39,4
17.	Vransko jezero, motel	crvenperka	11	20,0
18.	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	bodorka	51	22,4

Liofilizacija je provedena u liofilizatoru (Slika 1.4.1.2. a) i za svaki uzorak je trajala 72 sata. Liofilizirani uzorci su odvagani, kako bi se odredila masa liofiliziranog uzorka, odnosno izračunala prosječna suha tvar u mišiću i cijeloj ribi. Srednja vrijednost suhe tvari u cijeloj ribi za sve postaje iznosi 25% (raspon 20-38%) (Tablica 1.4.1.2.), dok za mišić riba sa svih postaja iznosi 22% (raspon 18-39%) (Tablica 1.4.1.3.). Prema tome, analize su provedene u liofiliziranim uzorcima čija suha masa potrebna za mjerenje prioriternih tvari u cijeloj ribi iznosi oko 50 g, a u mišiću ribe oko 70 g.



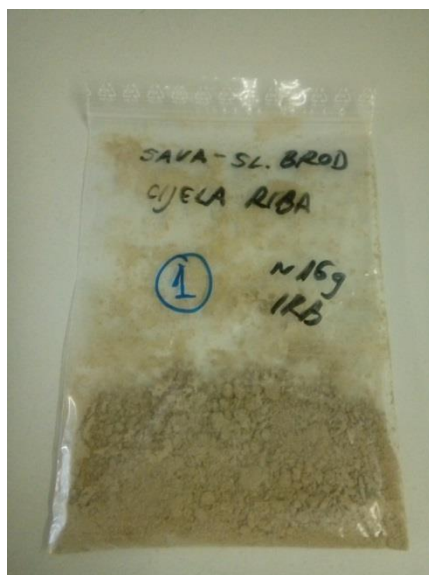
a)



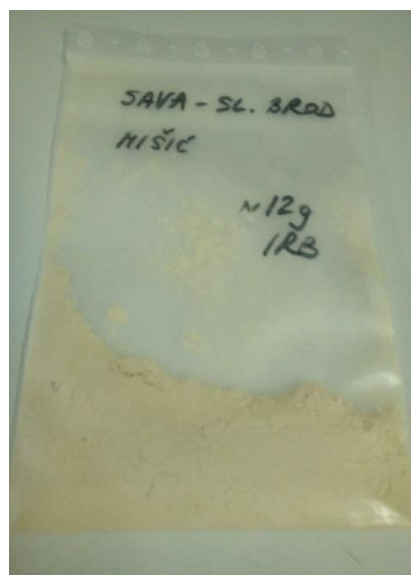
b)

Slika 1.4.1.2. Uređaj za: a) liofilizaciju (Labconco FreeZone 2.5); b) kriogeno mljevenje uzoraka (6875 Freezer/Mill, Spex Sample Prep)

Uzorci iz svih posudica za liofilizaciju su objedinjeni u jedan uzorak cijele ribe, odnosno mišića za svaku postaju, a kako bi se analize provele u homogenom i usitnjenom uzorku još su dodatno usitnjene u kriogenom mlinu (Slika 1.4.1.2. b) do praha (Slika 1.4.1.3.).



a)



b)

Slika 1.4.1.3. Uzorak: a) cijele ribe; b) mišića ribe usitnjen u kriogenom mlinu

1.4.2. Postupci pripreme uzoraka školjkaša za analize prioriternih tvari

Priprema uzoraka školjkaša za analize benzo(a)pirena i fluorantena obuhvaća odmrzavanje jedinki školjkaša na filter papiru, cijeđenje viška vode te određivanje sljedećih mjera:

- dužine školjkaša (izmjerena pomičnom mjerkom od vrha (umbo) do suprotne strane ljuštore, izražava se u cm) (Slika 1.4.2.1.);
- ukupne mase školjkaša (izmjerena laboratorijskom vagom; izražava se u g).



Slika 1.4.2.1. Određivanje dužine školjkaša pomičnom mjerkom

Nakon odvajanja mekog tkiva školjkaša od ljuštore pomoću skalpela, još su određene sljedeće mjere:

- masa ljuštore (izmjerena laboratorijskom vagom; izražava se u g);
- masa mekog tkiva školjkaša (izmjerena laboratorijskom vagom; izražava se u g).

Tablica 1.4.2.1. Srednje vrijednosti dužine ljuštore (cm), ukupne mase te mase mekog tkiva i ljuštore (g) analiziranih školjkaša na 6 mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE ŠKOLJKAŠA	PROSJEČNA DUŽINA LJUŠTURE	PROSJEČNA UKUPNA MASA ŠKOLJKAŠA	PROSJEČNA MASA MEKOG TKIVA	PROSJEČNA MASA LJUŠTURE
			cm	g	g	g
1.	Sava, nizvodno od Slavonskog Broda	<i>Unio pictorum</i>	10,1	95,4	29,0	31,7
2.	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	<i>Anodonta anatina</i>	7,4	31,1	8,7	16,7
7.	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	<i>Unio pictorum</i>	9,1	34,8	10,3	18,3
10.	Akumulacija Borovik	<i>Unio tumidus</i>	6,9	26,8	7,3	17,2
11.	Bednja, Mali Bukovec	<i>Unio pictorum</i>	6,5	23,1	7,3	12,4
18.	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	<i>Unio elongatulus</i>	8,9	33,8	11,8	15,0

Meko tkivo školjkaša prebačeno je u prethodno odvagano posudicu za liofilizaciju. Posudica s uzorkom je ponovo izvagana kako bi se odredila točna mokra masa mekog tkiva školjkaša za analize te je pohranjena na -80°C do liofilizacije.

Cijelo meko tkivo školjkaša koristi se za analize benzo(a)pirena i fluorantena za koje je odvojeno 40-80 g mokre mase tkiva školjkaša, odnosno na šest mjernih postaja gdje su uzorkovani školjkaši za analize je uzeto od 5 do 10 jedinki školjkaša po postaji (Tablica 1.4.2.2.).

Tablica 1.4.2.2. Broj analiziranih jedinki i prosječna suha tvar (%) školjkaša za analize benzo(a)pirena i fluorantena na 6 mjernih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE ŠKOLJKAŠA	UKUPAN BROJ ANALIZIRANIH JEDINKI	PROSJEČNA SUHA TVAR
				%
1.	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	<i>Unio pictorum</i>	5	9,3
2.	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	<i>Anodonta anatina</i>	5	16,8
7.	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	<i>Unio pictorum</i>	8	13,8
10.	Akumulacija Borovik	<i>Unio tumidus</i>	9	13,1
11.	Bednja, Mali Bukovec	<i>Unio pictorum</i>	10	15,0
18.	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	<i>Unio elongatulus</i>	7	15,2

Liofilizacija je provedena u liofilizatoru (Slika 1.4.1.2. a) i za svaki je uzorak trajala 72 sata. Liofilizirani uzorci su odvagani, kako bi se odredila masa liofiliziranog uzorka, odnosno izračunala prosječna suha tvar u mekom tkivu školjkaša. Srednja vrijednost suhe tvari u mekom tkivu školjkaša sa 6 mjernih postaja iznosi 14% (raspon od 9 do 17%). Prema tome, analize su provedene u liofiliziranim uzorcima čija je suha masa iznosila oko 10 g. Kako bi se analize provele u homogenom i usitnjenom uzorku još je dodatno svaki liofilizirani uzorak usitnjen u kriogenom mlinu (Slika 1.4.1.2. b) do praha (Slika 1.4.2.2.).



Slika 1.4.2.2. Uzorak školjkaša usitnjen u kriogenom mlinu

1.4.3. Postupci pripreme uzoraka rakušaca za analize prioritetnih tvari

Rakušci su uzorkovani Surberovom mrežom na dodatnim postajama koje predstavljaju njihovo specifično stanište i gdje se može uloviti dovoljan broj jedinki, odnosno u rijeci Krki te šest sljemenskih potoka. S obzirom da se metodologija obrade i analize benzo(a)pirena i fluorantena u rakušaca tek treba razviti, uzorkovan je različit broj jedinki rakušaca, a time i raspon masa za analize sa 7 mjernih postaja. Konkretno, broj uzorkovanih jedinki sa 7 postaja bio je u rasponu od 28 do 2926, dok je mokra masa analiziranih rakušaca na 7 postaja bila u rasponu od 0,7 do 14 g (Tablica 1.4.3.1.).

Tablica 1.4.3.1. Broj analiziranih jedinki rakušaca, njihova mokra masa (g) te prosječna suha tvar (%) za analize benzo(a)pirena i fluorantena na 7 odabranih dodatnih postaja preliminarnog monitoringa

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RAKUŠACA	UKUPAN BROJ ANALIZIRANIH JEDINKI	MOKRA MASA ANALIZIRANIH JEDINKI	PROSJEČNA SUHA TVAR
				g	%
1.	rijeka Krka, Skradinski buk	<i>Gammarus balcanicus</i>	28	0,9	25,6
2.	Sljeme, Kraljevac	<i>Gammarus sp.</i>	68	0,7	34,3
3.	Sljeme, Markuševačka Trnava	<i>Gammarus sp.</i>	1489	8,0	30,4
4.	Sljeme, prtok Blizneca	<i>Gammarus sp.</i>	776	4,6	24,8
5.	Sljeme, Baćun	<i>Gammarus sp.</i>	979	6,7	25,1
6.	Sljeme, Vidovec	<i>Gammarus sp.</i>	140	1,1	23,4
7.	Sljeme, Gračanski ribnjak	<i>Gammarus sp.</i>	2926	13,7	32,6

Neposredno prije pripreme uzoraka za analize, jedinke rakušaca su odležane na filter papiru da se upije višak vode, zatim je što točnije prebrojan broj jedinki te su prebačene i izvagane u posudici za liofilizaciju kako bi se odredila točna mokra masa rakušaca za analize. Posudica s rakušcima pohranjena je na -80°C do liofilizacije u liofilizatoru (Slika 1.4.1.2. a) koja je trajala 72 sata. Liofilizirani uzorci su odvagani, kako bi se odredila masa liofiliziranog uzorka, odnosno izračunala prosječna suha tvar u cijelom organizmu rakušaca. S obzirom da je srednja vrijednost suhe tvari u rakušaca sa svih postaja 28% (raspon od 23 do 34%) (Tablica 1.4.3.1.), analize su provedene u liofiliziranim uzorcima čija je suha masa iznosila u prosjeku 1,5 g (raspon po postajama od 0,2 do 4,5 g). Kako bi se analize provele u homogenom i usitnjenom uzorku još je dodatno svaki liofilizirani uzorak usitnjen u kriogenom mlinu (Slika 1.4.1.2. b) do praha (Slika 1.4.3.1.).



Slika 1.4.3.1. Uzorak rakušaca usitnjen u kriogenom mlinu

1.5. Analize prioritarnih tvari u uzorcima biote

Analize pojedinih prioritarnih tvari obavljene su u laboratorijima Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković (IRB-ZIMO, Zagreb) te u Nacionalnom laboratoriju za zdravlje, okoliš i hranu (NLZOH, Maribor, Slovenija). Osnovni podaci vezani uz analize prioritarnih tvari u bioti prikazani su u Tablici 1.5.1.

Tablica 1.5.1. Osnovne informacije o provedenim analizama prioritarnih tvari u bioti

Prioritarna tvar	Odgovorni laboratorij	Metoda/standard	Granica kvantifikacije (µg/kg m.t.)	Mjerna nesigurnost	Ispunjeni zahtjevi Direktive 2009/90/EC
Heksaklorobutadien	IRB-ZIMO	GC-MS (bazirano na normi HRN EN ISO 6468: 2002)	1	25 % na GK	DA
Heksaklorobenzen	IRB-ZIMO		1	30 % na GK	DA
PAH (fluoranteni i benzo(a)piren)	IRB-ZIMO	GC-MS (bazirano na normi HRN EN ISO 18287: 2011)	1	25 % na GK	DA
Polibromirani difenileteri (PBDE)	NLZOH	HRGC/HRMS (bazirano na EPA 1614)	0,001	20 % na GK	DA
Perfluorooktansulfonska kiselina i njezini derivati (PFOS)	IRB-ZIMO	LC-MS/MS (bazirano na normi ISO 25101:2009)	0,5	35 % na GK	DA
Heksabromociklododekan	IRB-ZIMO	LC-MS/MS (ISO/NP 21677)	0,5	25 % na GK	DA
Heptaklor i heptaklorepoksid	IRB-ZIMO	GC-MS (bazirano na normi HRN EN ISO 6468:2002)	1	35 % na GK	NE
Hg (i njezini spojevi)	IRB-ZIMO	CV-AAS (bazirano na normi HRN EN 13806:2003)	1	15 % na GK	DA
Dikofol	NLZOH	GC-MS (bazirano na IM/GC-MSD/SOP 105)	20	50 % na GK	DA
Dioksini i njima slični spojevi	NLZOH	HRGC/HRMS (bazirano na EPA 1613B, EPA 1668C)	0,001	20 % na GK	DA

1.5.1. Priprema i mjerenje ukupne Hg u tkivu riba

Na približno 0,2 g uzorka biote potrebno je dodati kiseline visoke čistoće (Suprapur®): 1 mL perklorne kiseline (HClO₄, 70 %) i 9 mL dušične kiseline (HNO₃, 65 %). Uzorci se podvrgnu postupku razgradnje na vrućoj ploči (engl. hot plate) 10 sati. Nakon hlađenja, uzorci se razrijeđe Milli-Q vodom do konačnog volumena od 20 mL. Koncentracije Hg mjere se

metodom atomske apsorpcijske spektrometrije hladnih para (CV-AAS – engl. cold vapour atomic absorption spectrometry) na uređaju Mercury Monitor 3200 (Thermo Separation Products, SAD) (Slika 1.5.1.1.). Ova metoda obuhvaća redukciju kemijskih vrsta žive u Hg(0) s otopinom 10 % kositrovog(II) klorida (SnCl_2), adsorpciju/desorpciju na zlatnoj žici te detekciju Hg(0) na AAS detektoru. Slijepu probu (blank) sustava predstavlja signal Hg u otopini SnCl_2 nakon što se kroz nju više puta propusti struja čistog dušika. U tako pročišćenu otopinu dodaje se poznata količina standardne otopine Hg koja se izmjeri te se potom izmjeri uzorak poznatog volumena. Granica detekcije metode, izračunata na temelju 3 standardne devijacije mjerenja slijepe probe (Milli-Q voda), iznosi 0,001 mg/kg. Validacija metode je provedena višekratnim mjerenjem certificiranog referentnog materijala IAEA-452 (homogenizirano tkivo *Pecten maximus*) i ERM®-BB422 (mišićno tkivo *Pollachius virens*). Sve izmjerene koncentracije bile su unutar 5 % od certificirane vrijednosti, koja za referentni materijal IAEA-452 iznosi $0,16 \pm 0,02$ mg/kg s.t., a za referentni materijal $0,601 \pm 0,030$ mg/kg s.t.



Slika 1.5.1.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija hladnih para (CV-AAS – engl. cold vapour atomic absorption spectrometry; Mercury Monitor 3200, Thermo Separation Products, SAD)

1.5.2. Određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) u školjkašima i rakušcima

Koncentracije policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), fluorantena i benzo(a)pirena, analizirane su u 1-2 g liofiliziranog i homogeniziranog tkiva školjkaša (ekvival. težini 10-20 g svježeg uzorka). Ekstrakcija je provedena diklormetanom u uređaju za ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju (ASE 200; engl. Accelerated Solvent Extraction) pri uvjetima od 100 °C i 138 bara. Nakon uparavanja na rotacijskom uparivaču dobiveni ekstrakti pročišćeni su prvo gel-permeacijskom kromatografijom radi uklanjanja masti. Druga faza pričišćavanja uključivala je frakcionaciju ekstrakata na stupcu silikagela (5 g) aktiviranog žarenjem na 200 °C. Nakon ispiranja alkanske frakcije uzorka s kolone n-heksanom, PAH-ovi su eluirani s kolone s 20

ml smjese heksana i diklormetana (8:2). Tako pročišćena frakcija uparena je u rotacijskom uparivaču i otopljena u 0,5 ml n-heksana. Obradeni ekstrakt analiziran je na vezanom sustavu plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS (Agilent Technologies 7890A GC i MSD 5975C inert XL/CI), opremljenom kolonom DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Slika 1.5.2.1.). Za kromatografsko odjeljivanje PAH-ova primijenjeno je temperaturno programiranje brzinom 5 $^{\circ}$ C/min. u rasponu od 50 do 300 $^{\circ}$ C. Kvantitativno određivanje ciljanih spojeva provedeno je praćenjem odabranih iona uz upotrebu deuteriranih PAH-ova kao surogata. Granica kvantifikacije metode za fluoranten i benzo(a)piren iznosila je 0,1 μ g/kg, a mjerna nesigurnost iznosila je 15 %. Metoda je bazirana na normi HRN EN ISO 18287:2011.



Slika 1.5.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) za određivanje pesticida i PAH-ova.

1.5.3. Određivanje organoklorovih pesticida heksaklorbenzena, heptaklora i heptaklorepoksida u mišiću riba

Klorirani pesticidi heksaklorbenzen, heptaklor i heptaklorepoksid analizirani su u alikvotu liofiliziranog i homogeniziranog mišićnog tkiva riba (ekvival. težini 10 g svježeg uzorka) uz dodatak izotopski obilježenog pentaklobenzena i heksaklorcikloheksana (ϵ -HCH) kao internih standarda. Ekstrakcija je provedena diklormetanom u uređaju za ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju (ASE 200; engl. Accelerated Solvent Extraction) pri uvjetima od 100 $^{\circ}$ C i 138 bara. Nakon uparavanja na rotacijskom uparivaču dobiveni ekstrakti su prvo pročišćeni gel-permeacijskom kromatografijom te izmućkivanjem s koncentriranom sumpornom kiselinom (H_2SO_4) radi uklanjanja masti, a nakon toga je slijedila frakcionacija ekstrakata na kombiniranom stupcu aluminijskog oksida i silikagela. Pri tome su zasebno prikupljene dvije frakcije: nepolarna (eluacija n-heksanom), koja sadrži heksaklorbenzen te polarnija (eluacija smjesom heksana i diklormetana, 8:2) koja sadrži heptaklor i heptaklorepoksid. Te su frakcije ukoncentrirane na mali volumen (0,1-0,5 mL) i analizirane na vezanom sustavu plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS (Agilent Technologies 7890A GC i MSD 5975C inert XL/CI), uz kromatografsku separaciju na koloni DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)

(Slika 1.5.2.1.). Kvantitativno određivanje ciljanih spojeva provedeno je praćenjem odabranih iona (SIM) uz upotrebu obilježenog pentaklorbenzena i ϵ -HCH kao surogata. Granica kvantifikacije metode za heksaklorbenzen iznosila je 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a za heptaklor i heptaklorepoksid 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mjerna nesigurnost iznosila je 20 % za sva tri spoja. Metoda je bazirana na normi HRN EN ISO 6468:2002. Treba napomenuti da granica određivanja postignuta ovom tehnikom ne zadovoljava kriterij potreban za određivanje heptaklora i heptaklorepoksida čiji je SKVO izuzetno nizak (0,0067 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

1.5.4. Određivanje polibromiranih difeniletera (PBDE) u mišiću riba

Određivanje polibromiranih difeniletera (PBDE) provedeno je u alikvotu liofiliziranog i homogeniziranog mišićnog tkiva riba (ekvival. težini 15 g svježeg uzorka). Ekstrakt je priređen na isti način kao i za dioksine/poliklorirane bifenile (PCB). Uzorci kojima je prethodno dodana otopina izotopno obilježenih spojeva ekstrahirani su smjesom organskih otapala. Ekstrakti uzoraka pročišćeni su kolonskom kromatografijom uz upotrebu nekoliko različitih adsorbensa (kiseli, lužnati, neutralni silikagel). Završno pročišćavanje načinjeno je upotrebom kromatografije isključenjem, izolacija frakcije spojeva PBDE načinjena je na ugljikovoj koloni. Obradeni ekstrakt analiziran je na prisustvo kongenera BDE 28, 47, 99, 100, 153 i 154 na vezanom sustavu plinske kromatografije visoke razlučivosti i spektrometrije masa visoke razlučivosti (HRGC/HRMS). Kromatografska separacija provedena je na DB-5MS kapilarnoj koloni. Granica kvantifikacije za PBDE iznosi 0,1 pg/g liofilizata uz mjernu nesigurnost 15 %.

1.5.5. Određivanje heksaklorobutadiena (HCBd) i heksabromociklododekana (HBCDD) u cijeloj ribi

Heksaklorobutadien (HCBd) i heksabromociklododekan (HBCDD) analizirani su u alikvotu liofiliziranog i homogeniziranog uzorka cijele ribe (ekvival. težini 5 g svježeg uzorka) uz dodatak izotopski obilježenih surogata, pentaklorbenzena i α -HBCDD. Ekstrakcija je provedena diklormetanom u uređaju za ubrzanu visokotlačnu ekstrakciju (ASE 200; engl. Accelerated Solvent Extraction) pri uvjetima od 100 °C i 138 bara. Nakon uparavanja na rotacijskom uparivaču dobiveni ekstrakti pročišćeni su koncentriranom H_2SO_4 radi uklanjanja masti. Druga faza pročišćavanja uključivala je frakcionaciju ekstrakata na stupcu deaktiviranog aluminij oksida (5 % vode). Zasebno su prikupljene dvije frakcije: nepolarna (eluacija n-heksanom), koja sadrži HCBd te polarnija (eluacija smjesom heksana i diklormetana, 8:2) koja sadrži izomere HBCDD.

Dobivena frakcija koja sadrži HCBd ukoncentrirana je na mali volumen (0,5 mL) i analizirana plinskom kromatografijom uz detekciju na detektoru zahvata elektrona (ECD). Kvantitativno određivanje HCBd provedeno je uz upotrebu izotopski obilježenog pentaklorbenzena kao

surogata. Granica kvantifikacije metode za HCBDD bila je 0,1 µg/kg, a mjerna nesigurnost iznosila je 20 %.

HBCDD frakcija uparena je do suha i prebačena u 0,5 mL metanola te je analizirana na vezanom sustavu tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa LC-MS/MS (Thermo Electron TSQ AM, San Jose, CA, USA) (Slika 1.5.5.1.), koji je bio opremljen izvorom za ionizaciju elektroraspršenjem. Određivanje triju izomera (α , β , γ) HBCDD provedeno je u negativnom načinu rada nakon HPLC separacije u sustavu s obrnutom fazom na koloni Varian C18, 5 µm, 150x4,6 mm. Detekcija ciljanih sastojaka provedena je metodom praćenja karakterističnih tranzicija na masenom analizatoru s trostrukim kvadrupolom. Kvantitativno određivanje izomera HBCDD provedeno je uz upotrebu izotopski obilježenog surogata α -HBCDD. Granica kvantifikacije za HBCDD iznosila je 0,1 µg/kg, a mjerna nesigurnost bila je 20 %.



Slika 1.5.5.1. Vezani sustav tekućinska kromatografija tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS) za određivanje herbicida, PFOS i HBCDD.

1.5.6. Određivanje perfluorooktansulfonske kiseline (PFOS) u mišiću riba

Određivanje perfluorosulfonske kiseline (PFOS) i perfluoroktanske kiseline (PFOA) u uzorcima riba uključivalo je ekstrakciju alikvota liofiliziranog mišićnog tkiva (ekvival. težini 1 g svježeg uzorka) metanolom, pročišćavanje ekstrakta na kolonici za ekstrakciju na čvrstoj fazi Oasis HLB te konačnu analizu ekstrakata na vezanom sustavu tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS) na uređaju Thermo Electron TSQ AM (San Jose, CA, USA) (Slika 1.5.5.1.). Dvostruka ekstrakcija metanolom provedena je na laboratorijskoj tresilici (350 okr./min.). Nakon centrifugiranja (5 min., 2000 okr./min.), bistri su ekstrakti udruženi i upareni na manji volumen (0,5 mL) te su pročišćeni na kolonici Oasis HLB. Pročišćeni ekstrakti upareni su na 0,5 mL i analizirani na vezanom sustavu LC-MS/MS uz primjenu ionizacije elektroraspršenjem u negativnom načinu rada. Kromatografsko odjeljivanje PFOS i PFOA načinjeno je u sustavu s obrnutom fazom na koloni Synergi MAX, 4 µm, 150x3 mm. Detekcija ciljanih sastojaka načinjena je metodom praćenja karakterističnih tranzicija na masenom analizatoru s trostrukim kvadrupolom. Kvantitativno određivanje

provedeno je uz upotrebu izotopski obilježenih surogata PFOS i PFOA. Granica kvantifikacije za PFOS iznosila je 0,1 µg/kg, a mjerna nesigurnost bila je 20 %.

1.5.7. Određivanje dikofola u mišiću riba

Određivanje dikofola provedeno je internom GC/MS metodom koju primjenjuje NLZOH, baziranoj na IM/GC-MSD/SOP 105, uz mjernu nesigurnost od 50%. Homogeniziranim uzorcima dodana je standardna otopina internog standarda. Uzorci su zatim ekstrahirani acetonitrilom. Ekstrakti uzoraka pročišćeni su na različitim SPE kolonama (polimerni sorbens, aluminijev oksid). Ekstrakti uzoraka analizirani su metodom GC/MS praćenjem odabranih iona (SIM).

1.5.8. Određivanje dioksina i njima sličnih spojeva u mišiću riba

Određivanje dioksina i njima sličnih spojeva (poliklorirani dibenzofurani i koplanarni poliklorirani bifenili) provedeno je metodom koju primjenjuje NLZOH uz upotrebu vezanog sustava plinske kromatografije visoke razlučivosti i spektrometrije masa visoke razlučivosti (HRGC/HRMS) (Slika 1.5.8.1.). Uzorci kojima je prethodno dodana otopina izotopno obilježenih spojeva ekstrahirani su smjesom organskih otapala. Ekstrakti uzoraka pročišćeni su kolonskom kromatografijom uz upotrebu nekoliko različitih adsorbensa (kiseli, lužnati, neutralni silikagel). Završno pročišćavanje načinjeno je upotrebom kromatografije isključenjem te separacija, a izolacija frakcije spojeva PCDD/F načinjena je na ugljikovoj koloni. Ekstrakti uzoraka potom su analizirani metodom HRGC/HRMS.



Slika 1.5.8.1. Vezani sustav plinske kromatografije visoke razlučivosti i spektrometrije masa visoke razlučivosti (HRGC/HRMS-Finnigan MAT 95 XL-upgraded to MAT XP) za određivanje dioksina u bioti

Parametri metoda za određivanje dikofola te dioksina i njima sličnih spojeva u mišiću ribe opisani su u Tablici 1.5.8.1.

Tablica 1.5.8.1. Osnovne informacije o metodi za analizu difokola te dioksina i njemu sličnih spojeva u bioti koju je proveo NLZOH iz Maribora (Slovenija)

Pokazatelj	Metoda	Oznaka norme	Mjerna nesigurnost	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Dikofol	GC/MS	IM/GC-MSD/SOP 105	50%	10	20
Dioksini i spojevi poput dioksina					
2,3,7,8-T4CDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,7,8-PCCDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,7,8-H6CDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,6,7,8-H6CDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,7,8,9-H6CDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3,7,8-T4CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,7,8-P5CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
2,3,4,7,8-P5CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,7,8-H6CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,6,7,8-H6CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,7,8,9-H6CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
2,3,4,6,7,8-H6CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00002	0,00005
1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
3,3',4,4'-T4CB (PCB 77)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
3,3',4',5-T4CB (PCB 81)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3,4,4',5-P5CB (PCB 114)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
3,3',4,4',5-P5CB (PCB 126)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3,3',4,4',5-H6CB (PCB 156)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001
2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189)	HRGC/HRMS	EPA 1613B, EPA 1668C	20%	0,00005	0,0001

2. REZULTATI

2.1. Uvodne napomene

Rezultati preliminarnog monitoringa prikazani su za 11 prioriternih tvari za koje su u Europi i Republici Hrvatskoj definirani standardi kakvoće okoliša (SKVO) za biotu. U svrhu ocjene kemijskog stanja vodnih tijela s obzirom na ustanovljene koncentracije prioriternih i prioriterno opasnih tvari, sve dobivene koncentracije prioriternih tvari uspoređene su s граниčnim vrijednostima navedenima u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/13, 151/14, 78/15 i 61/16), u kojoj su definirani standardi kakvoće okoliša (SKVO) za biotu (Tablica 2.1.1.).

Tablica 2.1.1. Popis prioriternih tvari za koje su definirane SKVO za biotu.

Broj	Naziv prioriternne tvari	CAS broj	EU broj	Utvrđena kao prioriterna opasna tvar	Standard kakvoće za biotu (SKVO _{biota}) (µg/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 (zbroy TE)
(43)	Heksabromociklododekan (HBCDD)	25637-99-4 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

2.2. Koncentracije prioriternih tvari u bioti površinskih kopnenih voda

Koncentracije prioriternih tvari određene su u bioti površinskih kopnenih voda s 18 mjernih postaja preliminarnog monitoringa te na dodatnih 7 postaja na kojima su uzorkovani rakušci. Rezultati su prikazani po skupinama organizama koji su korišteni kao indikatorski organizmi, odnosno za ribe na 18 mjernih postaja, školjkaše na 6 mjernih postaja (Tablica 2.2.1.) te za rakušce na dodatnih 7 postaja (Tablica 2.2.2.) u okviru preliminarnog monitoringa tijekom 2017. godine. Crvenom bojom označene su vrijednosti koje premašuju SKVO_{biota} za pojedinu prioriternu tvar, a plavom one vrijednosti koje su ispod SKVO_{biota}.

Tablica 2.2.1. Koncentracije prioriternih tvari ($\mu\text{g}/\text{kg m.t.}$) određene u cijeloj ribi (CR), mišiću riba (MR) i školjkašima (ŠK) površinskih kopnenih voda na 18 mjernih postaja preliminarnog monitoringa tijekom 2017. godine

R. BR.	ŠIFRA	MJERNA POSTAJA	polibromirani difenileteri	fluoranten	heksaklorobenzen	heksaklorobutadien	Ukupna Hg	benzo(a)piren	dikofol	PFOS i njezini derivati	dioksini i spojevi poput dioksina (zbroj TE)	Heksabromociklodo dekan	heptaklor i heptakloreposid
			MR	ŠK	MR	CR	CR	ŠK	CR	MR	MR	CR	MR
1.	10005	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	0,1509	11,2	0,04	<0,1	70,7	3,8	<10	0,7	0,00067	2,9	<0,05
2.	10010	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	0,0832	22,1	0,043	<0,1	68,3	0,5	<10	0,6	0,00018	0,6	<0,05
3.	10016	Sava, Jankomir	<0,0001		0,05	0,1	62,8		<10	7,6	0,00011	1,1	<0,05
4.	10017	Sava, Drenje-Jesenice	0,0002		0,078	<0,1	63,5		<10	9,4	0,00023	1,2	<0,05
5.	10019	Sava, Rugvica	0,3235		0,109	<0,1	49,6		<10	6,0	0,00069	4,8	<0,05
6.	12002	Bosut, Apševci	0,0047		0,008	<0,1	22,7		<10	1,8	0,00004	<0,1	<0,05
7.	15112	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	0,1193	1,5	0,022	<0,1	85,9	0,2	<10	0,1	0,00012	0,1	0,056
8.	19000	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	0,0029		0,017	<0,1	30,3		<10	<0,1	<0,00001	<0,1	<0,05
9.	19001	Plitvička jezera, jezero Kozjak	0,0923		0,022	<0,1	45,3		<10	0,6	0,0007	0,1	<0,05
10.	21030	Akumulacija Borovik	0,0122	0,9	0,034	<0,1	37,5	<0,1	<10	0,4	0,00039	<0,1	<0,05
11.	21085	Bednja, Mali Bukovec	<0,0001	1,6	0,025	<0,1	54,5	0,1	<10	1,3	0,00006	1,3	<0,05
12.	29020	Dunav, Ilok - most	<0,0001		<0,01	<0,1	104,3		<10	2,8	0,00021	0,8	<0,05
13.	29141	Drava, Legrad	0,0851		0,446	<0,1	22,3		<10	4,8	<0,00001	0,3	0,052
14.	29210	Mura, Goričan	0,0002		0,085	0,1	14,9		<10	1,8	0,00032	0,3	0,083

R. BR.	ŠIFRA	MJERNA POSTAJA	polibromirani difenileteri	fluoranten	heksaklorobenzen	heksaklorobutadien	Ukupna Hg	benzo(a)piren	dikofol	PFOS i njezini derivati	dioksini i spojevi poput dioksina (zbroj TE)	Heksabromociklodo dekan	heptaklor i heptakloreposid
			µg/kg m.t.										
15.	30120	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	<0,0001		0,013	<0,1	62,1		<10	0,7	0,00002	<0,1	<0,05
16.	40111	Cetina, Radmanove Mlinice	0,4221		0,429	<0,1	92,4		<10	1,1	0,00082	0,3	0,072
17.	40311	Vransko jezero, motel	0,0015		0,01	<0,1	9,3		<10	0,6	0,00021	0,1	<0,05
18.	40520	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	<0,0001	0,7	0,024	<0,1	28,4	<0,1	<10	0,2	0,00013	0,1	<0,05
		SKVO_{biota} (NN 78/15), µg /kg m.t.	0,0085	30	10	55	20	5	33	9,1	0,0065	167	0,0067

Tablica 2.2.2. Koncentracije prioriternih tvari (µg /kg m.t.) određene u rakušcima površinskih kopnenih voda na 7 dodatnih postaja preliminarnog monitoringa tijekom 2017. godine

R. BR.	MJERNA POSTAJA	fluoranten	benzo(a)piren
		µg/kg m.t.	
1.	rijeka Krka, Skradinski buk	3,1	0,1
2.	Sljeme, Kraljevac	10,2	0,8
3.	Sljeme, Markuševačka Trnava	11,3	0,4
4.	Sljeme, prtok Blizneca	4,6	0,2
5.	Sljeme, Baćun	7,1	0,5
6.	Sljeme, Vidovec	14,6	0,2
7.	Sljeme, Gračanski ribnjak	6,8	0,7
	SKVO_{biota} (NN 78/15), µg /kg m.t.	30	5

Sve analize prioritetnih tvari koje su provedene u cijeloj ribi ili mišiću riba na 18 mjernih postaja uključuju vrste riba čije su prehrambene karakteristike, trofički nivo i biometrijski parametri prikazani u Tablici 2.2.3.

Tablica 2.2.3. Vrste uzorkovanih riba, prehrambena grupa i trofički nivo kojem pripadaju te prosječna totalna dužina i starost

R. BR.	MJERNA POSTAJA	VRSTE RIBA	PREHRAMBENA GRUPA	TROFIČKI NIVO	PROSJEČNA TOTALNA DUŽINA RIBA	PROSJEČNA STAROST RIBA
					cm	god.
1.	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	klen	svežder	2,7 ± 0,1	15,5	4
2.	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	klen	svežder	2,7 ± 0,1	18,2	4
3.	Sava, Jankomir	klen	svežder	2,7 ± 0,1	15,6	4
4.	Sava, Drenje-Jesenice	klen	svežder	2,7 ± 0,1	19,8	4
5.	Sava, Rugvica	klen	svežder	2,7 ± 0,1	13,0	3
6.	Bosut, Apševci	babuška	svežder	2,5 ± 0,0	11,6	3
7.	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	patuljasti somić	svežder	3,8 ± 0,4	14,2	3
8.	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	klen	svežder	2,7 ± 0,1	28,2	5
9.	Plitvička jezera, jezero Kozjak	klen	svežder	2,7 ± 0,1	25,8	5
10.	Akumulacija Borovik	patuljasti somić	svežder	3,8 ± 0,4	14,8	3
11.	Bednja, Mali Bukovec	klen	svežder	2,7 ± 0,1	13,7	3
12.	Dunav, Ilok - most	klen	svežder	2,7 ± 0,1	15,2	4
13.	Drava, Legrad	klen	svežder	2,7 ± 0,1	8,5	2
14.	Mura, Goričan	klen	svežder	2,7 ± 0,1	15,6	4
15.	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	bodorka	svežder	3,0 ± 0,0	6,5	2
16.	Cetina, Radmanove Mlinice	jegulja	svežder	3,6 ± 0,3	40,1	3
17.	Vransko jezero, motel	crvenperka	svežder	2,9 ± 0,39	19,7	4
18.	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	bodorka	svežder	3,0 ± 0,0	10,7	3

Na 18 postaja na kojima je provedeno uzorkovanje riba u okviru preliminarnog monitoringa biote u površinskim kopnenim vodama tijekom 2017. godine uzorkovano je 6 različitih vrsta riba. Na 11 postaja su ulovljeni klenovi, zatim na po dvije postaje patuljasti somić i bodorka te na jednoj postaji babuška, crvenperka i jegulja. Sve navedene vrste riba su svežderi (Tablica 2.2.3.), dakle usporedive su po načinu prehrane. Trofički nivo (TL) uzorkovanih vrsta se razlikuje, od 2,5 za babušku do 3,8 za patuljastog somića (Tablica 2.2.3.), ali približno odgovara zahtjevima direktive (TL = 3,5 - 4,5). Starost riba (procijenjena prema dužini) uglavnom se kreće od 3 do 5 godina, što također odgovara zahtjevima direktive (3-5 godina). Iznimke su

predstavljali klenovi iz Drave i bodorke iz jezera Vrana, čija je starost procijenjena na 2 godine (Tablica 2.2.3.).

U svrhu što preglednije interpretacije rezultata ovog preliminarnog nadzornog monitoringa biote u površinskim kopnenim vodama, prioritetne tvari grupirane su u nekoliko karakterističnih kategorija zagađivala koje uključuju:

- Hg kao jedinu anorgansku prioritetnu tvar;
- policikličke aromatske ugljikovodike - fluoranten (Flu) i benzo(a)piren (BaP);
- organoklorove pesticide (heksaklorbenzen, heptaklor, heptaklorepoksid i dikofol);
- dioksine i njima srodne spojeve;
- industrijsko otapalo heksaklorbutadien (HCBD);
- polibromirane usporivače gorenja - polibromirane difeniletere (PBDE) i heksabromociklododekan (HBCDD);
- perfluorooktansulfonsku kiselinu (PFOS) i njezine derivate.

Pri tom je razmatrano prije svega primarno pitanje zadovoljavaju li izmjerene koncentracije propisani SKVO_{biota}, ali je pozornost posvećena i pitanjima prostorne raspodjele u različitim tipovima kopnenih površinskih voda, odnosno raspodjeli onečišćenja u Republici Hrvatskoj. U tu svrhu su lokacije uzorkovanja grupirane po zemljopisnoj sličnosti kako slijedi: rijeka Sava od od najzapadnije do najistočnije postaje, rijeke porječja Drave u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Drava, Mura, Bednja), rijeke istočne Hrvatske (Dunav, Bosut), rijeke južne Hrvatske (Cetina) te akumulacije (Pakra i Borovik) i jezera (Prošćansko, Kozjak, Vransko, Baćinska jezera i Vrana).

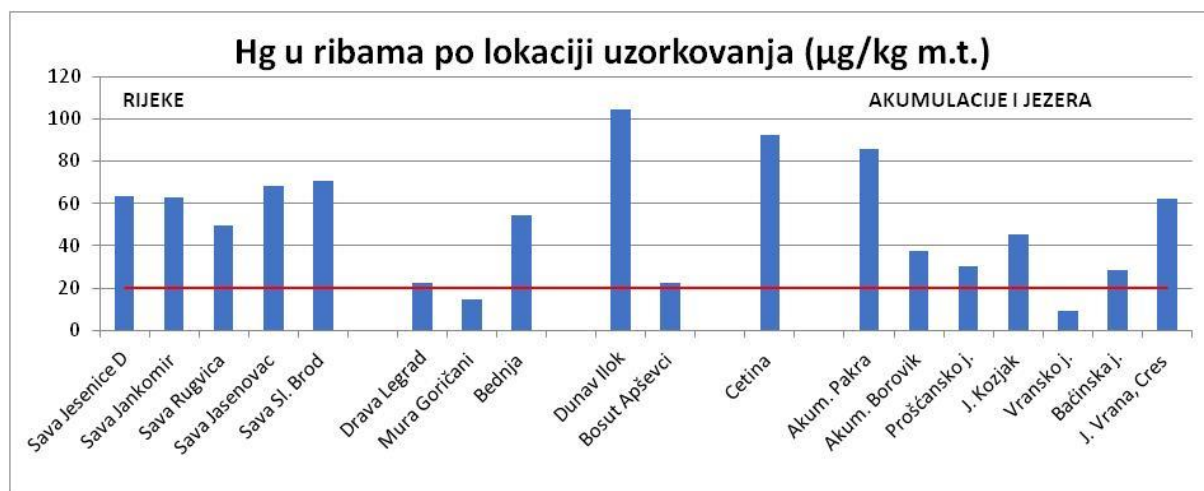
Osim navedenog, načinjen je i pokušaju da se prikaže prva procjena o prikladnosti odabranih vrsta te da se preliminarno ukaže na probleme upotrebe različitih vrsta organizama u sustavnom monitoringu, što je ponekad nužno zbog objektivnih okolnosti vezanih uz ograničenu rasprostranjenost odabranih vrsta (upotreba različitih vrsta riba kao indikatorskih organizama za praćenje prioritetnih tvari u bioti, usporedba primjene školjkaša i rakušaca za monitoring PAH-ova).

2.2.1. Koncentracija ukupne Hg u cijeloj ribi

Od 4 metala (Cd, Pb, Ni, Hg) koji su definirani kao prioritetne tvari Okvirnom direktivom o vodama Europske unije 2000/60/EC (EC, 2000) i koje treba pratiti u vodnim ekosustavima u okviru monitoringa, samo je Hg potrebno pratiti u bioti. Razlog tome je visoka toksičnost i sposobnost biomagnifikacije organometalnog spoja žive, metil-žive (MeHg) koja nastaje u okolišu prirodnim procesom biometilacije. Proces biometilacije odvija se prvenstveno u površinskim sedimentima koji obično sadrže <1 % MeHg, međutim, zbog afiniteta vezivanja Hg

za proteine ona se akumulira u vodenim organizmima što rezultira porastom koncentracije Hg i udjela MeHg u vodenom trofičkom lancu (biomagnifikacija), tako da ribe na višem trofičkom nivou obično sadrže 50-100 % MeHg. U okviru definiranja standarda za zaštitu okoliša za biotu (SKVO_{biota}) u okviru Okvirne direktive o vodama procijenjeno je da je zaštita ekosustava, tj. zaštita predatora od unošenja previsoke koncentracije Hg putem konzumacije plijena (zaštita od sekundarnog trovanja) kritičnija nego zaštita ljudskog zdravlja od unosa previsoke količine Hg putem konzumacije vodenih organizama. Zbog toga je prema naputcima Europske komisije u Dokumentu br. 32 „O monitoringu biote (primjena SKVO za biotu) u okviru Europske direktive o vodama“ (EZ, 2014) potrebno analizirati Hg u cijelim ribama (koje konzumiraju predatori) i to u ribama koje su po mogućnosti stare 3-5 godina i nalaze se na trofičkom nivou 3,5 - 4,5. Prema dostupnim saznanjima o toksičnosti Hg u ribama za ptice i sisavce koje ih konzumiraju definirana je vrijednost SKVO_{biota} za Hg od 20 µg/kg m.t. (NN 78/2015, 61/16).

Na Slici 2.2.1.1. prikazana je raspodjela koncentracija Hg (µg/kg m.t.) u ribama s 18 mjernih postaja prioritarnog monitoringa koje su grupirane po zemljopisnoj sličnosti: rijeka Sava od najzapadnije do najistočnije lokacije, rijeke sjeverozapadne Hrvatske (Drava, Mura, Bednja), rijeke istočne Hrvatske (Dunav, Bosut), rijeke južne Hrvatske (Cetina) te akumulacije (Pakra i Borovik) i jezera (Prošćansko, Kozjak, Vransko i Baćinska).

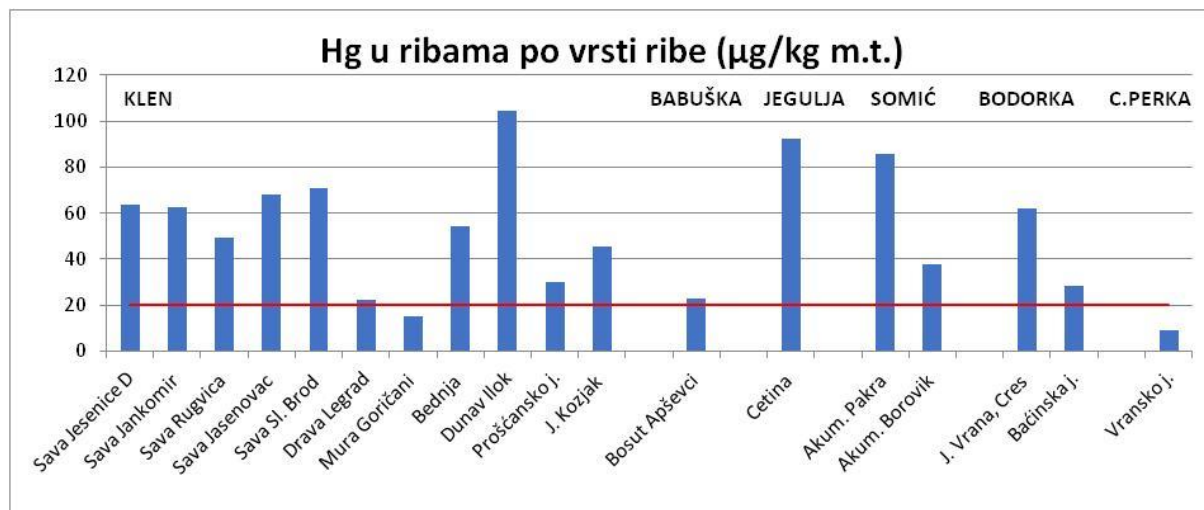


Slika 2.2.1.1. Raspodjela koncentracija Hg (µg/kg m.t.) u slatkovodnim ribama s 18 mjernih postaja nadzornog monitoringa koje su grupirane po zemljopisnoj sličnosti

Kao što se vidi, najviše vrijednosti koncentracije Hg, odnosno iznad 80 µg/kg m.t. izmjerene su u klenovima iz Dunava, jeguljama iz Cetine i patuljastim somićima iz akumulacije Pakra. Vrijednosti ispod SKVO_{biota} za Hg od 20 µg/kg m.t. izmjerene su samo u ribama iz rijeke Mure i Vranskog jezera te je očigledno da ovakvi rezultati ne ukazuju na pravilnosti po zemljopisnoj raspodjeli.

Na slici 2.2.1.2. prikazane su koncentracije Hg u ribama prema vrsti riba. Izmjerene koncentracije Hg kretale su se u rasponu od 9 do 104 µg/kg m.t. i osim u klenova iz rijeke Mure

te crvenperke iz Vranskog jezera sve su koncentracije bile više od SKVO_{biota} za Hg u ribama (20 µg/kg m.t.).



Slika 2.2.1.2. Raspodjela Hg u slatkovodnim ribama prema vrstama riba obuhvaćenih u okviru monitoringa prioritarnih tvari u bioti

Važno je naglasiti da je vrijednost SKVO za Hg u ribama, koja je na osnovu toksikoloških efekata definirana u Okvirnoj direktivi o vodama Europske unije (2000/60/EC), niža od svih dostupnih literaturnih podataka o koncentracijama Hg u ribama. Studija koja je usporedila podatke iz dugogodišnjeg monitoringa (1990.-2014.) prioritarnih tvari u Njemačkim rijekama (Fliedner i sur., 2016b) pokazala je da su gotovo sve izmjerene koncentracije Hg u ribama bile značajno više od SKVO, ali je također pokazala da koncentracije Hg u ribama opadaju u tom vremenskom periodu. Nedavno istraživanje provedeno u Njemačkoj u rijeci Dunav (Fliedner i sur., 2018) ukazalo je na visoke koncentracije Hg u slatkovodnim ribama (klen, deverika i smud) koje su se kretale 30-500 µg/kg m.t., a za klena su iznosile 30-242 µg/kg m.t. Razlike između 3 vrste riba su bile značajne zbog različitog načina prehrane, trofičkog nivoa i starosti riba, što sve značajno utječe na koncentraciju Hg u ribama.

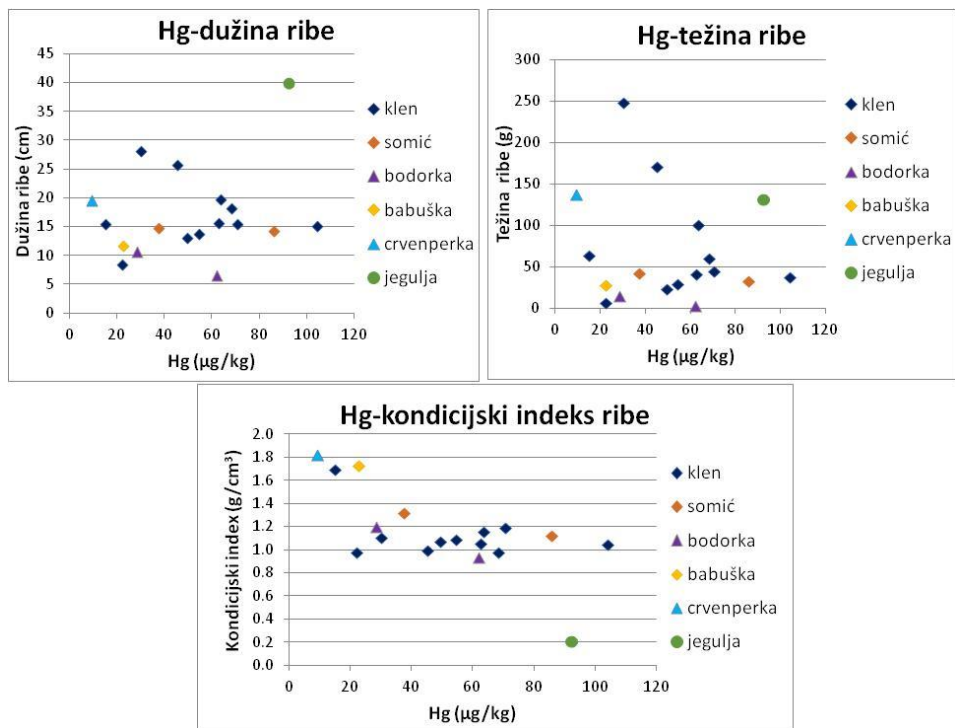
Činjenica da je u okviru monitoringa prioritarnih tvari u bioti uzorkovano 6 različitih vrsta riba u vodnim tijelima koja su vrlo različita (velike i male rijeke, akumulacije i prirodna jezera, nizinsko i krško područje) jako otežava interpretaciju dobivenih podataka. Naime, za one vrste riba koje su uzorkovane na više lokacija rasponi koncentracija Hg (µg/kg m.t.) se preklapaju (za klenove s 11 lokacija: 15-104; patuljaste somiće s 2 lokacije: 38-86; bodorke s 2 lokacije: 28-62) i razlike među vrstama nije moguće utvrditi iz ovih nekoliko preliminarnih mjerenja (Slika 2.2.1.2.). Ako promotrimo samo uzorke klena s 11 lokacija uočljivo je da je najviša koncentracija izmjerena u Dunavu, nešto niže koncentracije izmjerene su u rijeci Savi (i one su usporedive na svih 5 lokacija) te najniže u manjim rijekama Dravi, Muri i Bosutu (Slika 2.2.1.2.). Takva raspodjela bi mogla biti posljedica većeg antropogenog opterećenja velikih rijeka živom. Međutim, raspon koncentracija Hg izmjerenih u sedimentima Save, Drave, Dunava

i Cetine (Tablica 2.2.1.2., podaci iz godišnjih Izvješća Hrvatskih voda o stanju površinskih voda u Republici Hrvatskoj za period 2013.-2017.) nisu u skladu s tom hipotezom, jer su u Dunavu izmjerene niže koncentracije Hg u sedimentu nego u Savi i Dravi. U jegulji iz rijeke Cetine izmjerena je jedna od najviših koncentracija Hg (92 µg/kg m.t.), dok je koncentracija Hg u sedimentu rijeke Cetine bila niska (Tablica 2.2.1.2.). Očito je da koncentracija Hg u ribama u značajnoj mjeri ovisi o dostupnosti Hg biometilaciji i procesu biomagnifikacije u trofičkom lancu koji su specifični za svaki vodni ekosustav. Tako bi visoka koncentracija Hg u jegulji mogla biti posljedica činjenice da se ona nalazi na višem trofičkom nivou (TL = 3,6) nego klen (TL = 2,7) (Tablica 2.2.1.).

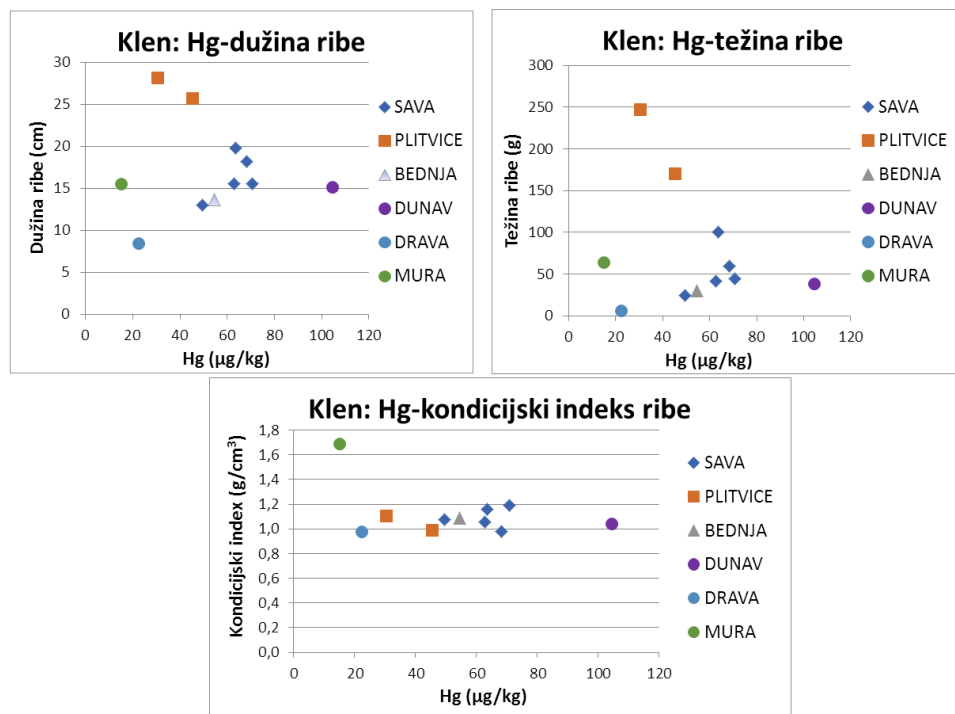
Tablica 2.2.1.2. Raspon koncentracija Hg u riječnim sedimentima u periodu 2013.-2017. godine na lokacijama koje su bile dostupne iz godišnjih Izvješća o stanju površinskih voda u Republici Hrvatskoj (Hrvatske vode, 2013.-2017.)

Lokacija	Koncentracija Hg (µg/kg) (broj podataka)
Sava, Jesenice-Drenje	0,189-0,564 (2)
Sava, Jasenovac	0,112-0,318 (4)
Drava, Botovo	0,061-0,374 (9)
Dunav, Ilok	0,060-0,234 (5)
Cetina, Radmanove Mlinice	0,031-0,110 (5)

Zbog izrazite bioakumulacije i spore eliminacije iz organizma, Hg se akumulira u ribama tijekom njihovog životnog vijeka. Brojne studije su pokazale da koncentracija Hg raste s veličinom, odnosno starošću riba, tako da je poznavanje veličine (starosti) riba važan čimbenik kod interpretacije rezultata. Zbog toga je u okviru monitoringa određivana veličina pojedinačnih riba i izračunata prosječna totalna dužina i masa riba za svaki kompozitni uzorak. Izračunat je i indeks kondicije riba (omjer mase i totalne dužine) koji upućuje na stupanj ishranjenosti riba. Na Slici 2.2.1.3. prikazani su za sve vrste riba odnosi između koncentracije Hg i njihove prosječne totalne dužine, mase i indeksa kondicije, a na Slici 2.2.1.4. prikazani su navedeni odnosi samo za klena. Očigledno je da koncentracija Hg nije korelirana s totalnom dužinom i masom riba kada se uzme u obzir ovakav kompozitni uzorak s pojedinih postaja (Slika 2.2.1.3.), što je vjerojatno posljedica malog broja uzoraka, različitih vrsta riba i različitih vodnih ekosustava iz kojih su ribe uzorkovane, a u kojima su fizičko-kemijski uvjeti koji značajno utječu na nastajanje MeHg i njezinu akumulaciju u biotu isto različiti. Ako se pogledaju te ovisnosti samo za klena, uočljivo je da se klenovi iz istog slatkovodnog ekosustava (npr. rijeke Save) grupiraju zajedno, dok npr. stariji klenovi iz Plitvičkih jezera (procijenjene starosti 5 godina) sadrže niske koncentracije Hg (Slika 2.2.1.4.). Istovremeno indeks kondicije, ako se promatra sve vrste riba, negativno korelira s koncentracijom Hg, ali ipak za klena takva korelacija ne postoji. Dakle indeks kondicije, a i ostali biometrijski parametri, očito su karakteristični za pojedine vrste riba i njihovu ovisnost o koncentraciji Hg pogrešno je razmatrati za sve vrste zajedno.



Slika 2.2.1.3. Ovisnost koncentracije Hg u ribama o prosječnoj totalnoj dužini, masi i kondicijskom indeksu riba.



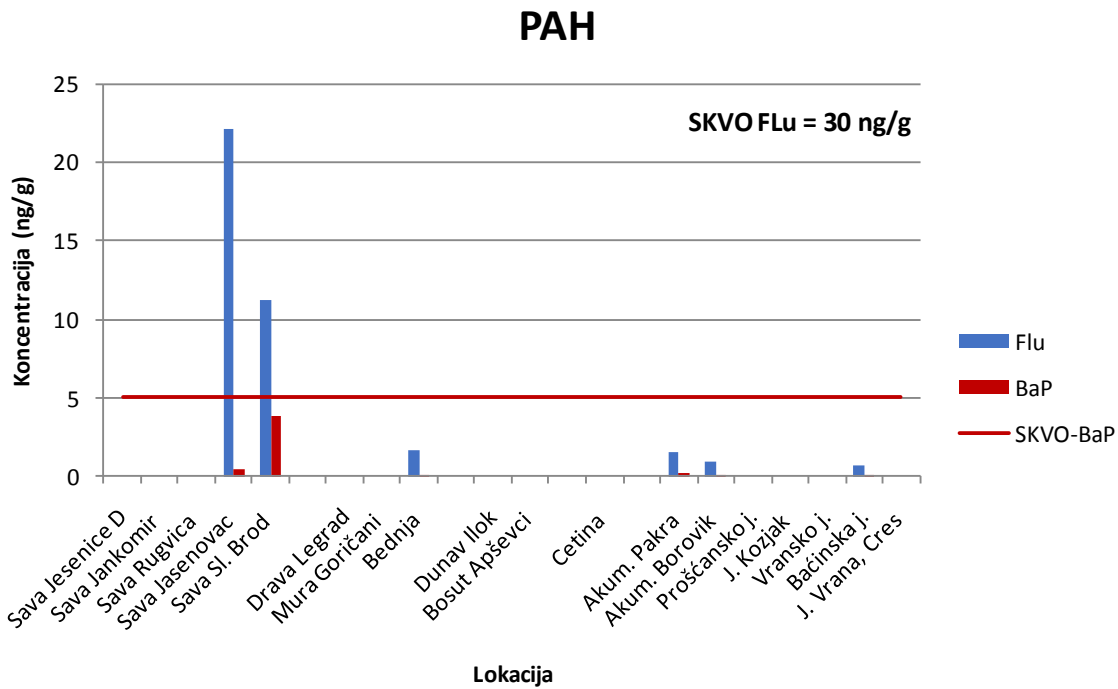
Slika 2.2.1.4. Ovisnost koncentracije Hg u klenova o prosječnoj totalnoj dužini, masi i kondicijskom indeksu riba.

Kako bi utvrdili u kojoj mjeri su koncentracije Hg u ribama u nekom vodnom ekosustavu povišene zbog antropogenog utjecaja, a koliko su posljedica prirodnog procesa biomagnifikacije koji je karakterističan za svako vodno tijelo, neophodno je u svakom pojedinom vodnom ekosustavu utvrditi ovisnost Hg o veličini ribe te pratiti koncentracije Hg u ribama kroz duži vremenski period. Za usporedbu različitih vodnih ekosustava u kojima se Hg određuje u različitim vrstama riba moguće je koristiti normalizaciju na standardnu suhu masu i trofički nivo prema preporukama Okvirne direktive o vodama Europske unije 2000/60/EC (EC, 2000), međutim istraživanja su pokazala da takva normalizacija nije dostatna i da je za uočavanje trendova najvažnije provoditi visoko standardiziran višegodišnji monitoring (Fliedner i sur., 2016a).

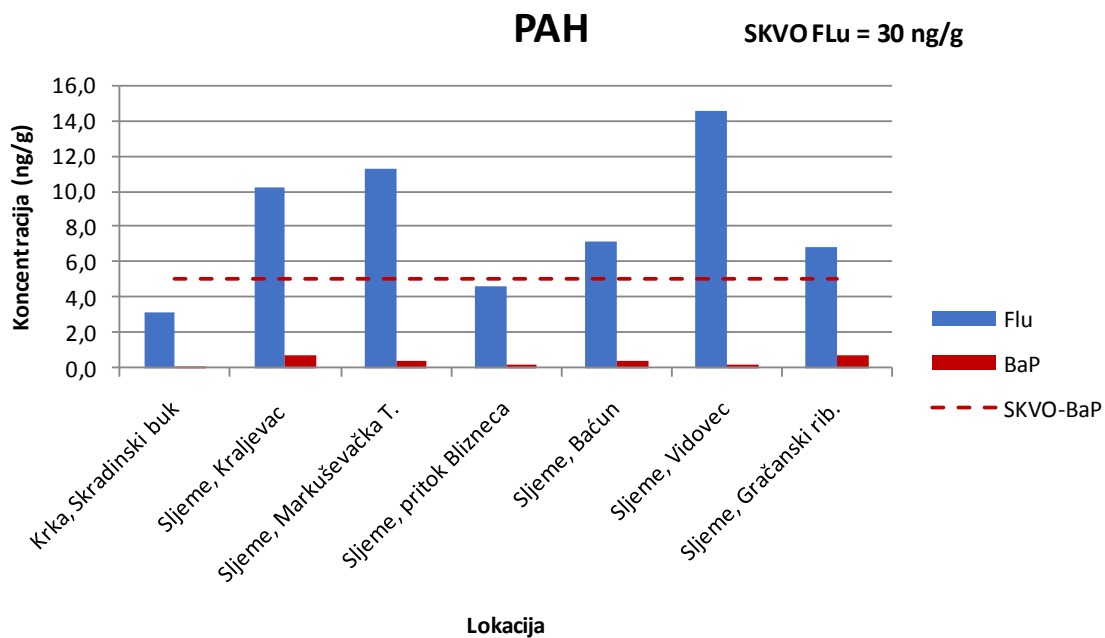
2.2.2. Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) u školjkašima i rakušcima površinskih kopnenih voda

Zbog intenzivne metaboličke transformacije u kralježnjacima, kao primarni indikatorski organizam za praćenje PAH-ova u bioti odabrani su školjkaši. Međutim, zbog njihove ograničene dostupnosti na pojedinim staništima, alternativno je ispitana i mogućnost upotrebe rakušaca za tu svrhu. Popis uzorkovanih vrsta i staništa na kojima su bile dostupne prikazan je u Tablicama 1.3.2.1. i 1.3.3.1. Na Slici 2.2.2.1. prikazana je raspodjela koncentracija dvaju PAH-ova za koje je propisan kriterij SKVO, fluorantena (Flu) i benzo(a)pirena (BaP), u školjkašima površinskih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine. Nažalost, uzorci školjkaša bili su dostupni na samo 6 od 18 odabranih mjernih postaja, pri čemu su jako prevladavale lokacije u vrlo čistim područjima kao što su akumulacije Pakra i Borovik te Baćinska jezera (raspon BaP <0,1 do 0,2 µg/kg). Povišene koncentracije, ali još uvijek ispod kriterija SKVO za Flu (30 µg/kg) i BaP (5 µg/kg), nađene su u rijeci Savi pri čemu je maksimalna koncentracija nađena kod Jasenovca (11 µg/kg Flu i 3,8 µg/kg BaP) (Slika 2.2.2.1., Tablica 2.2.1.). Ovaj utjecaj može se vjerojatno povezati s činjenicom da je ta lokacija smještena nizvodno od Rafinerije nafte Sisak.

Ispitana je i mogućnost primjene rakušaca kao indikatorskih organizama za monitoring PAH-ova, međutim i rakušci su prikupljeni na relativno čistim područjima kao što su sljemenski potoci i Nacionalni park Krka kod Skradinskog buka (Tablica 2.2.2.). Koncentracije u prikupljenim uzorcima varirale su za Flu od 3,1 do 11,3 µg/kg te za BaP od 0,1 do 0,8 µg/kg, s tim da su razine u sljemenskim potocima bile nešto više nego u rijeci Krki (Slika 2.2.2.2., Tablica 2.2.2.). Načelno, rakušci su se pokazali prikladnim organizmom za određivanje akumulacije PAH-ova u bioti, ali treba napomenuti da je provedba monitoring jako otežana, kako zbog problema u prikupljanju uzoraka, tako i zbog poteškoća da se prikupi dovoljna količina uzorka za analizu.



Slika 2.2.2.1. Raspodjela koncentracija fluorantena (Flu) i benzo(a)pirena (BaP) u školjkašima površinskih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine



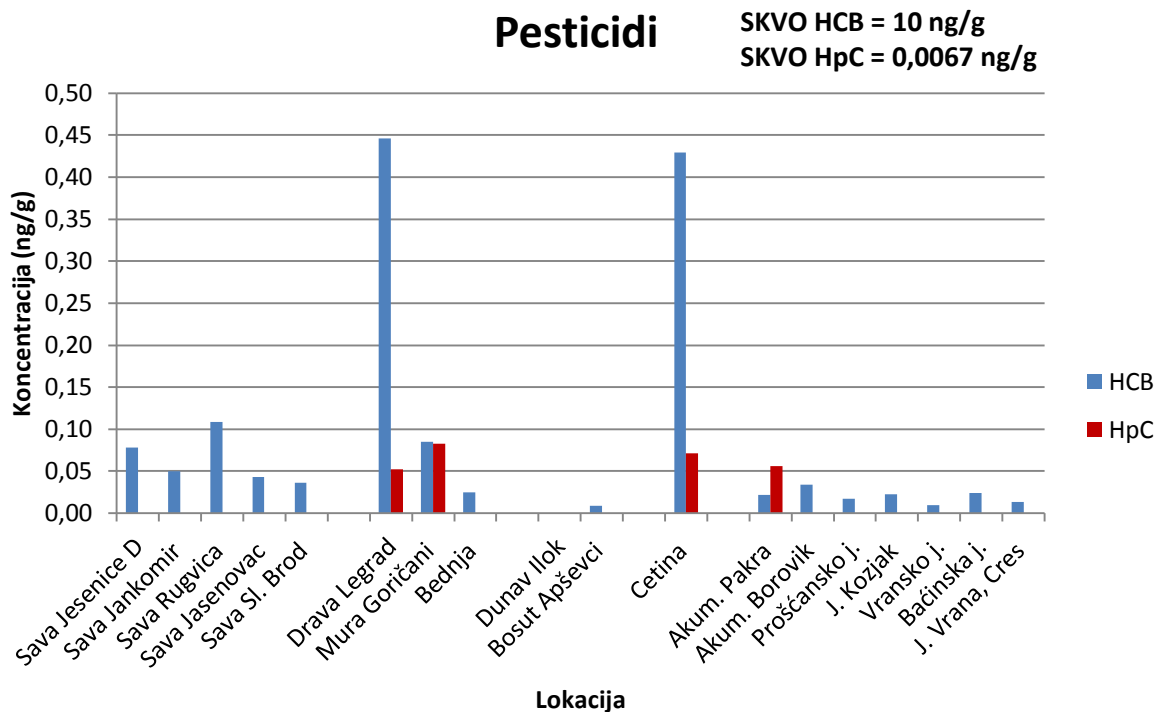
Slika 2.2.2.2. Raspodjela koncentracija fluorantena (Flu) i benzo(a)pirena (BaP) u rakušcima površinskih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine

Na temelju navedenog, predlaže se primjena alternativnih indikatorskih organizama iz skupine beskralježnjaka, a jedna od mogućnosti bi mogli biti slatkovodni puževi. Švedska studija iz 2015. godine pokazala je da se slatkovodni puževi iz porodice Lymnaeidae mogu uspješno koristiti u monitoringu PAH-ova (Karlsson et al., 2015).

2.2.3. Organoklorovi pesticidi u bioti površinskih kopnenih voda

Jedan od klasičnih tipova zagađivala koji se prate u uzorcima biote su organoklorovi insekticidi. Zbog svoje izrazite perzistentnosti ovi sastojci se vrlo dugo zadržavaju u okolišu te se njihov utjecaj može pratiti dugo nakon što se zakonom ograniči njihova upotreba. Nadalje, zbog izrazito lipofilnih svojstava ti se spojevi akumuliraju u sedimentima i bioti te u masnom tkivu mogu dostići vrlo visoke koncentracije usprkos niskim razinama u vodenom stupcu. Kako je većina tih toksičnih spojeva već dugo godina zabranjena u EU pa tako i u Hrvatskoj, očekuje se postepeni trend smanjenja njihovih koncentracija u svim dijelovima okoliša (Fliedner i sur., 2016b). Treba naglasiti da usprkos činjenici da se radi o prioritetnim tvarima koje se već dugo prate, postoje još uvijek brojni značajni metodološki problemi kada se radi o ispunjavanju zahtjeva koji proizlaze iz strogih SKVO, posebno za heptaklor i heptaklorepoksid (SKVO 0,0067 µg/kg) (Fliedner i sur., 2016a).

Na Slici 2.2.3.1. prikazana je raspodjela dvaju tipova organoklorovih pesticida, heksaklorbenzena (HCB) i sume heptaklora i heptaklorepoksida (HpC) u mišiću riba iz površinskih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine. Dikofol, koji također pripada u ovu skupinu, nije prikazan na slici jer su sve koncentracije bile niže od granice detekcije primijenjene metode (10 µg/kg), što je oko 3 puta niže od kriterija SKVO (33 µg/kg). Važno je naglasiti da su koncentracije pesticidnih prioritetnih tvari vrlo niske te nijedan uzorak ne premašuje koncentraciju od 1 µg/kg. Međutim, dok su takve koncentracije 10 puta niže od SKVO za HCB (10 µg/kg), zbog vrlo strogog kriterija za HpC (0,0067 µg/kg), za veći broj uzoraka ne može se načiniti ocjena stanja jer je granica određivanja (0,05 µg/kg) znatno viša od kriterija za SKVO. Na nekoliko lokacija (Drava, Mura, Cetina i akumulacija Pakra) koncentracije HpC su mjerljive i značajno premašuju kriterij SKVO (Slika 2.2.3.1., Tablica 2.2.1.). Zanimljivo je uočiti da je kod nekih od navedenih uzoraka povišena i koncentracija HCB, odnosno preko 0,4 µg/kg (Drava, Legrad i Cetina, Radmanove Mlinice) (Slika 2.2.3.1.). Objašnjenje za povišenu koncentraciju na inače čistoj lokaciji u rijeci Cetini kod Radmanovih Mlinica može se naći u činjenici da je jegulja riba s vrlo visokim udjelom masti što pospješuje akumulaciju lipofilnih pesticida. Ovo ujedno ukazuje i na važnost odabira istih, ili barem sličnih, vrsta za usporedno praćenje onečišćenja u različitim područjima.



Slika 2.2.3.1. Raspodjela dvaju tipova organoklorovih pesticida, heksaklorbenzena (HCB) i sume heptaklora i heptaklorepoksida (HpC) u mišiću riba iz površinskih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine.

2.2.4. Dioksini i njima slični spojevi u bioti površinskih kopnenih voda

Dioksini i njima slični spojevi u koje ubrajamo i poliklorirane dibenzofurane (PCDF) i koplanarne PCB-e imaju vrlo nisku vrijednost SKVO u ribama (0,0065 $\mu\text{g}/\text{kg TE}$) koja se može usporediti s onom za heptaklor i heptaklorepoksid. Treba, međutim napomenuti da se u slučaju dioksina ne radi o izravno mjerenim vrijednostima koncentracija već o ekvivalentima toksičnosti (TE) kakvu bi imala koncentracija najtoksičnijeg predstavnika dioksina, 2,3,7,8-TCDD (koji, dakle, ima faktor toksičnosti 1). Rezultati mjerenja pokazali su da je u svim uzorcima koncentracija kongenera 2,3,7,8-TCDD niža od granice određivanja metode (0,00005 $\mu\text{g}/\text{kg}$) što je, ujedno, i znatno niže od kriterija SKVO za dioksine. U nekim uzorcima (npr. Mura, Goričan; Drava, Legrad; lokacije na rijeci Savi te, iznenađujuće, Bačinska jezera), detektirani su PBC-i slični dioksinima i PCDF-i, ali kod koncentracija čiji je ekvivalent toksičnosti bio vrlo nizak te nije bitno promijenio konačni rezultat izražen u ekvivalentima toksičnosti. Mjerljiv konačni iznos TE detektiran je na razinama od 0,0001 do 0,0008 $\mu\text{g}/\text{kg}$ što je znatno niže od kriterija SKVO (0,0065), a najviše koncentracije zabilježene su na lokacijama Cetina, Radmanove

Mlinice (0,00082 µg/kg), Plitvička jezera, jezero Kozjak (0,0007 µg/kg) te na dvije lokacije na rijeci Savi, Rugvica (0,00069 µg/kg) i Slavonski Brod (0,00067 µg/kg).

2.2.5. Heksaklorbutadien (HCBD) u bioti površinskih kopnenih voda

Dioksini i njima slični spojevi u koje ubrajamo i poliklorirane dibenzofurane (PCDF) i koplanarne PCB-e imaju vrlo nisku vrijednost SKVO u ribama (0,0065 µg/kg TE) koja se može usporediti s onom za heptaklor i heptaklorepoksid. Treba, međutim napomenuti da se u slučaju dioksina ne radi o izravno mjenjenim vrijednostima koncentracija već o ekvivalentima toksičnosti (TE) kakvu bi imala koncentracija najtoksičnijeg predstavnika dioksina, 2,3,7,8-TCDD (koji, dakle, ima faktor toksičnosti 1). Rezultati mjerenja pokazali su da je u svim uzorcima koncentracija kongenera 2,3,7,8-TCDD niža od granice određivanja metode (0,00005 µg/kg) što je, ujedno, i znatno niže od kriterija SKVO za dioksine. U nekim uzorcima (npr. Mura, Goričan; Drava, Legrad; lokacije na rijeci Savi te, iznenađujuće, Baćinska jezera), detektirani su PCB-i slični dioksinima i PCDF-i, ali kod koncentracija čiji je ekvivalent toksičnosti bio vrlo nizak te nije bitno promijenio konačni rezultat izražen u ekvivalentima toksičnosti. Mjerljiv konačni iznos TE detektiran je na razinama od 0,0001 do 0,0008 µg/kg što je znatno niže od kriterija SKVO (0,0065), a najviše koncentracije zabilježene su na lokacijama Cetina, Radmanove Mlinice (0,00082 µg/kg), Plitvička jezera, jezero Kozjak (0,0007 µg/kg) te na dvije lokacije na rijeci Savi, Rugvica (0,00069 µg/kg) i Slavonski Brod (0,00067 µg/kg).

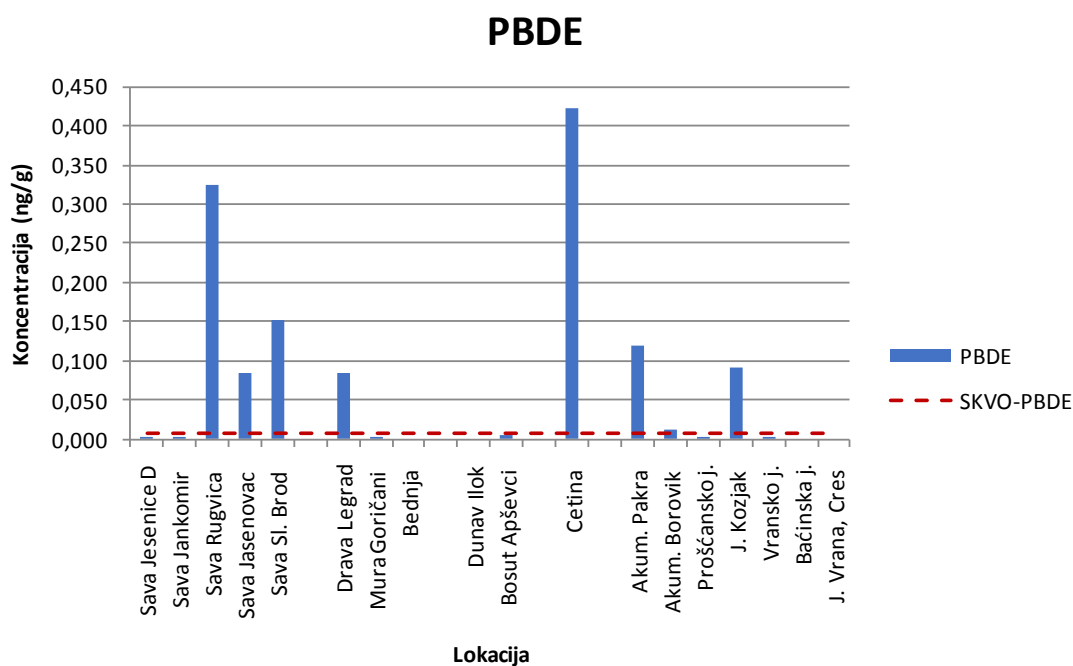
2.2.6. Polibromirani usporivači gorenja u bioti površinskih kopnenih voda

Prema hrvatskoj regulativi kriterij SKVO u bioti propisan je za dva tipa polibromiranih usporivača gorenja, polibromirane difeniletere (PBDE) i heksabromociklododekan (HBCDD). Iako su vrijednosti SKVO za ove dvije skupine prioritarnih tvari vrlo različite, zbog sličnosti u njihovom kemijskom karakteru i, posljedično, sličnom ponašanju u okolišu, prikladno je stanje opterećenosti tim tvarima promatrati usporedno.

Pri tom treba naglasiti da se PBDE određuju prema kriteriju koji je izveden iz njihova mogućeg utjecaja na ljudsko zdravlje putem konzumacije kontaminiranih jestivih vodenih organizama, dok se HBCDD-i promatraju prije svega u kontekstu njihovog mogućeg utjecaja na predatore zbog sekundarnog trovanja. Posljedično tome, PBDE-i se prate u mišiću riba uz primjenu vrlo strogog kriterija SKVO od 0,0085 µg/kg za sumu 6 odabranih kongenera, dok se HBCDD-i određuju u cijeloj ribi pri čemu je kriterij oko 20000 puta blaži (167 µg/kg).

Na Slici 2.2.6.1. prikazana je raspodjela PBDE u prikupljenim uzorcima riba. Koncentracije su varirale u širokom rasponu od <0,0001 do 0,422 µg/kg (sr. vrijednost 0,07 µg/kg), a na nekoliko lokacija zabilježeno je značajno prekoračenje SKVO. To se, prije svega odnosi na neke lokacije

na rijeci Savi (Rugvica, Jasenovac, Slavonski Brod) i Dravu kod Legrada. Međutim, povišene vrijednosti iznad SKVO nađene su i u riba iz čistih vodnih tijela, kao što su jezero Kozjak, akumulacija Pakra i ponajviše Cetina kod Radmanovih Mlinica (0,422 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Slika 2.2.6.1., Tablica 2.2.1.). Za lokaciju kod Radmanovih Mlinica objašnjenje može biti u tome što se analiza odnosi na jegulju s vrlo visokim udjelom masti. Za ostale lokacije koje su bile izvan očekivanih vrijednosti prema stupnju antropogenog opterećenja u okruženju lokacije te prema ostalim pokazateljima opterećenja lipofilnim biokumulativnim prioritetnim tvarima, teško je samo na temelju ovih preliminarnih mjerenja naći zadovoljavajuće objašnjenje. Posebno iznenađuju vrlo niske razine nađene na nekim lokacijama u rijeci Savi (Drenje-Jesenice, Jankomir) te u Dunavu (Ilok) i Muri (Goričan). Inače, strogi kriterij SKVO za PBDE tema je intenzivnih rasprava u EU jer se pokazalo da u većini područja razine PBDE u ribama znatno premašuju propisani kriterij (Ejarrat i Barcelo, 2018).

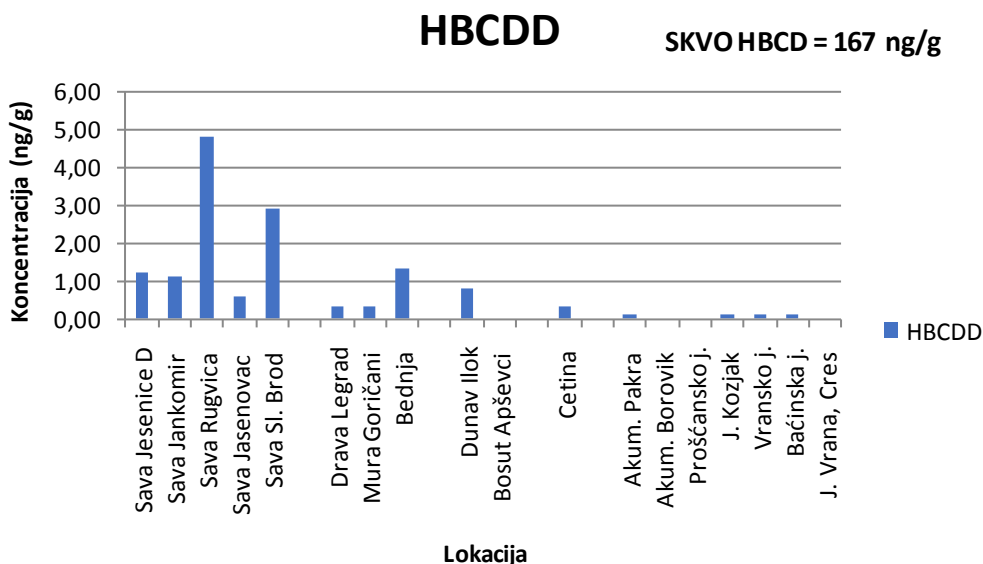


Slika 2.2.6.1. Raspodjela polibromiranih difeniletera (PBDE) u mišiću riba iz površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine.

Iako već spomenuti rad naglašava da je u Europi prisutan trend smanjenja koncentracija PBDE (Fliedner i sur., 2016b), dinamika smanjenja je takva da se ne može očekivati da se zahtijevana razina SKVO dostigne do 2021. godine kako to predviđa Okvirna direktiva EU o vodama (EZ, 2000). S ovim problemom očito će se suočiti gotovo sve članice EU te su potrebni sustavni dogovori oko implementacije kriterija i, dakako, dodatnih mjera za smanjenje utjecaja PBDE na okoliš. Zbog toga bi u sljedećem razdoblju ovom pokazatelju trebalo posvetiti posebnu pozornost

i provoditi kontinuirana mjerenja kako bi se odredile višegodišnje promjene u koncentraciji PBDE.

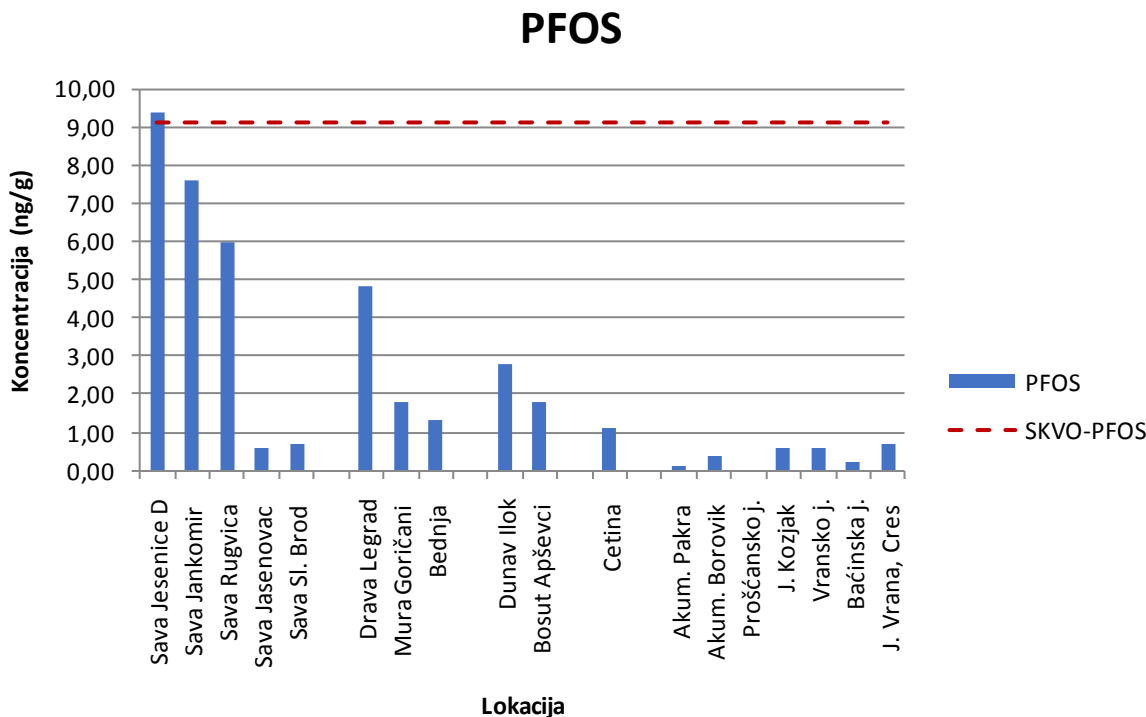
Raspodjela druge skupine usporivača gorenja heksabromociklododekana (HBCDD) u ribama površinskih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine prikazana je na Slici 2.2.6.2. Kao kod PBDE, raspon koncentracija u analiziranim uzorcima također je širok (od <0,1 do 4,8 µg/kg), a srednja koncentracija je dosta viša (1,0 µg/kg). Prostorna raspodjela koncentracija u promatranim vodnim tijelima u skladu je s očekivanim antropogenim pritiscima. Najviša razina zabilježena je u rijeci Savi nizvodno od Zagreba (Rugvica) te kod Slavenskog Broda što se može objasniti značajnim unosima otpadnih voda u to vodno tijelo. Povišene razine izmjerene su i u uzorku riba iz Bednje (1,3 µg/kg), a nešto niže, ali mjerljive razine nađene su i u drugim velikim rijekama kao što su Dunav, Drava, Mura i Cetina. U akumulacijama i jezerima zabilježene su, očekivano, vrlo niske koncentracije (Slika 2.2.6.2.). Treba na kraju naglasiti da su sve izmjerene koncentracije znatno niže od kriterija SKVO (167 µg/kg) te ne postoji indikacija da bi moglo doći do ugroze kvalitete biote ovim prioritetnim tvarima (Tablica 2.2.1.). Ovdje se može načiniti usporedba s PBDE, čija je srednja koncentracija više od 10 puta niža od HBCDD, ali zbog strogog kriterija SKVO upravo je taj pokazatelj često kritičan u pogledu zadovoljavanja postavljenih kriterija stanja okoliša.



Slika 2.2.6.2. Raspodjela heksabromociklododekana (HBCD) u cijelim ribama iz površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine

2.2.7. Perfluorooktansulfonska kiselina (PFOS) u bioti površinskih kopnenih voda

Perfluorooktansulfonska kiselina (PFOS) i njezini derivati su višenamjenski industrijski aditivi i zbog svojih perzistentnih svojstava široko su rasprostranjeni u vodnom okolišu. U ovoj su studiji određivani PFOS te srodna tvar perfluorooktanska kiselina (PFOA). Kako PFOA nije pokazala značajniju akumulaciju u ispitivanim ribama, u ovom će prikazu biti diskutirani samo rezultati određivanja PFOS-a. Raspodjela PFOS u ribama iz površinskih voda Republike Hrvatske prikazana je na Slici 2.2.7.1. Rezultati pokazuju da su PFOS bile prisutne u analiziranim ribama u značajnim koncentracijama (raspon 0,1-9,4 µg/kg; sr. vrijednost 2,38 µg/kg). Najviše koncentracije su prema očekivanju u vodnim tijelima s najizrazitijim antropogenim pritiscima, a to su prije svega velike rijeke koje služe kao recipijenti otpadnih voda i industrije većih urbanih cjelina (Sava, Drava, Mura, Dunav, Bosut). Nasuprot tome, koncentracije u istraživanim akumulacijama i jezerima znatno su niže. Posebno se ističu povišene koncentracije na širem području grada Zagreba (Jankomir, Rugvica) koje su vrlo blizu SKVO (9,1 µg/kg). Međutim, očigledno je da povišenoj razini PFOS na tom vodotoku rijeke Save znatno doprinose i uzvodni izvori te je na graničnoj lokaciji Sava, Drenje-Jesenice zabilježena koncentracija koja je premašivala SKVO (9,4 µg/kg) (Slika 2.2.7.1., Tablica 2.2.1.). Na temelju ovih preliminarnih rezultata može se zaključiti da PFOS predstavlja važan tip onečišćenja u rijeci Savi, ali i nekim drugim većim rijekama te bi ovom pitanju u budućnosti trebalo posvetiti povećanu pozornost i pažljivo pratiti trendove tijekom višegodišnjeg monitoringa.

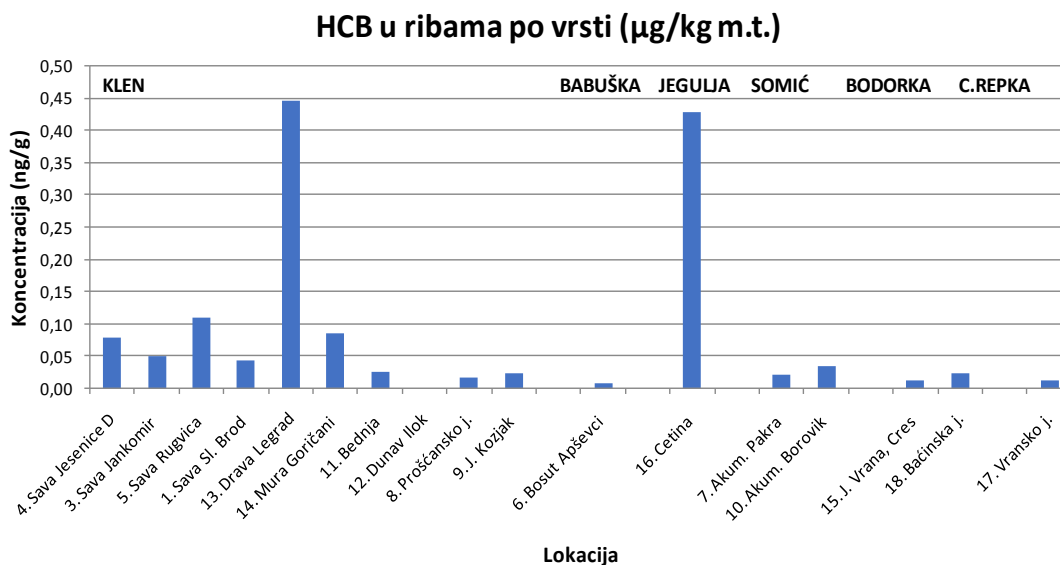


Slika 2.2.7.1. Raspodjela perfluorooktansulfonske kiseline (PFOS) u mišiću riba iz površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske tijekom 2017. godine.

2.2.8. Napomene o utjecaju izbora vrste organizama i njihovih biometrijskih podataka na monitoring organskih prioriternih tvari u bioti

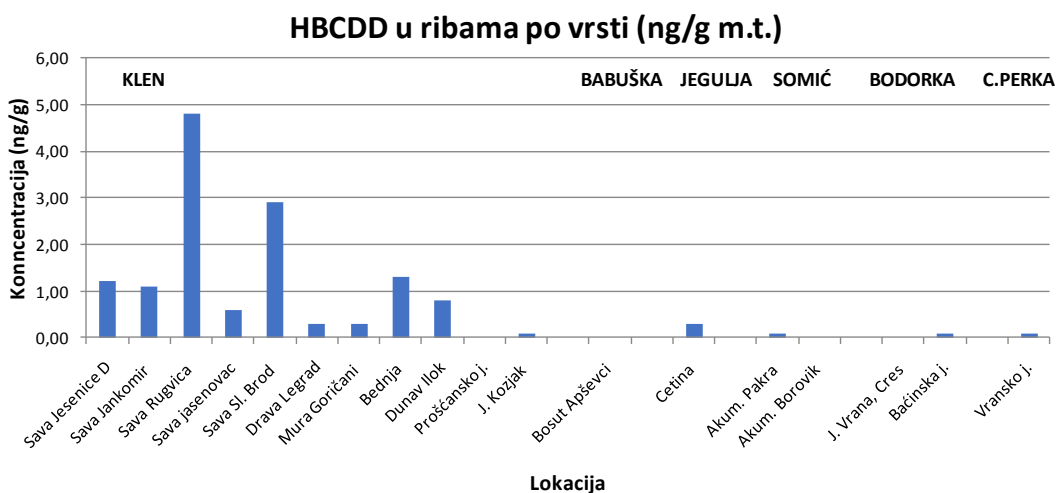
Iako format ove preliminarne studije ne dopušta detaljnu analizu mogućeg utjecaja izbora vrsta i biometrijskih pokazatelja na ishod monitoringa prioriternih organskih tvari u bioti, načinjen je pokušaj da se za mjerljive prioritne tvari dokumentiraju neka zapažanja koja bi mogla poslužiti kao osnova za buduće aktivnosti praćenja kakvoće površinskih kopnenih voda na temelju analize uzoraka biote.

Na slici 2.2.8.1. prikazana je raspodjela heksaklorbenzena u ribama, kao tipičnog predstavnika organoklorovih pesticida obuhvaćenih monitoringom, pri čemu su uzorci na apscisi, osim prema geografskom principu, poredani i prema različitim vrstama riba u pojedinim vodnim tijelima. Najviše podataka postoji za klena, a lokacije na kojima je uzorkovana ova vrsta uključuju opterećenije vodotoke kao što su velike rijeke (Sava, Drava i Dunav), ali i čista referentna područja kao što su Plitvička jezera. Očito je da rezultati odražavaju razliku između rijeka opterećenih zagađenjem i čistih vodnih tijela te da se jasno izdvajaju lokacije s izrazitim povišenjem HCB-a u ribama (Drava, Legrad). Dakako, treba naglasiti još jednom da se u slučaju HCB-a niti na jednoj postaji ne radi o prekoračenju SKVO (10 µg/kg) (Tablica 2.2.1.). Nadalje, prikazana raspodjela po vrstama riba ukazuje da se može računati na relativnu usporedivost rezultata za ribe koje pripadaju sličnom trofičkom nivou (klen, babuška, bodorka i crvenperka) (Tablica 2.2.3.). RIBE koje pripadaju višoj trofičkoj razini (jegulja i patuljasti somić) pokazuju povišene razine koje se ne mogu objasniti antropogenim pritiscima na ispitivane lokacije. To se posebno odnosi na jegulju iz rijeke Cetine kod koje se povišena koncentracija HCB-a može dodatno objasniti povećanim udjelom masti u ovoj vrsti ribe. Iako se koncentracija prioriternih tvari u ocjeni zadovoljavanja kriterija SKVO odnosi na mokru težinu uzorka, očigledno bi za bolju interpretaciju rezultata trebalo raspolagati podatkom o udjelu masti. U znanstvenoj je literaturi čak uobičajenije da se koncentracije lipofilnih tvari izražavaju na sadržaj ekstrahiranih lipidnih tvari (masti).



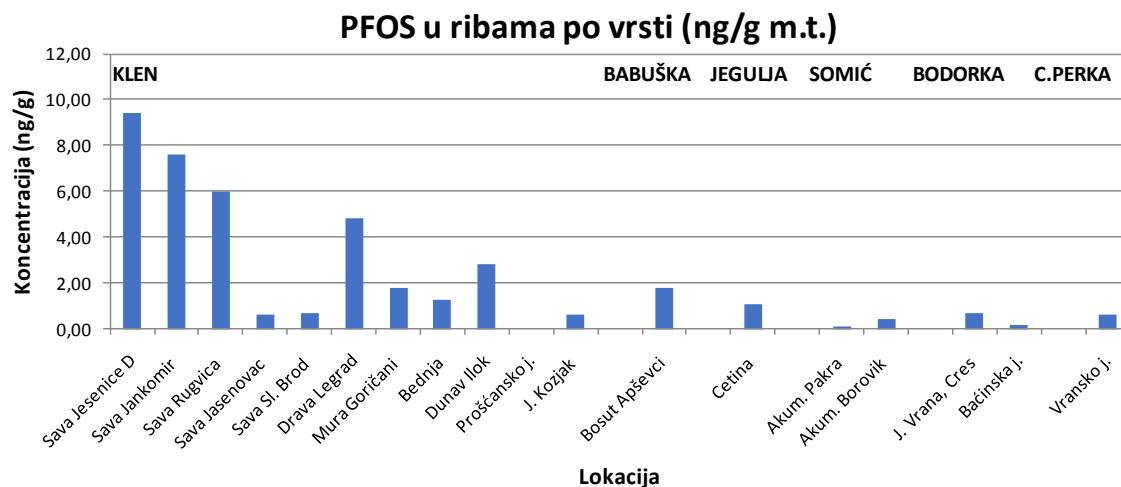
Slika 2.2.8.1. Raspodjela heksaklorbenzena (HCB) u slatkovodnim ribama raspoređenim prema vrstama i području uzorkovanja.

Slične zaključke može se izvesti i na temelju analiza usporivača gorenja HBCDD-a u slatkovodnim ribama (Slika 2.2.2.8). Odnosi koncentracija u klenu u rijeci Savi u potpunosti odgovaraju antropogenim pritiscima na pojedinim lokacijama te je maksimalna koncentracija određena nizvodno od Zagreba (Sava, Rugvica). Vrlo niske razine nađene su u čistim područjima kao što su jezero Vrana i akumulacija Borovik ($<0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$). U tom kontekstu, zanimljivo je ukazati na nešto povišenu koncentraciju u jegulji iz rijeke Cetine (Slika 2.2.8.2.) što se može povezati s već opisanim osobinama jegulje kao indikatorskog organizma.



Slika 2.2.8.2. Raspodjela heksabromociklododekana (HBCDD) u slatkovodnim ribama raspoređenim prema vrstama i području uzorkovanja.

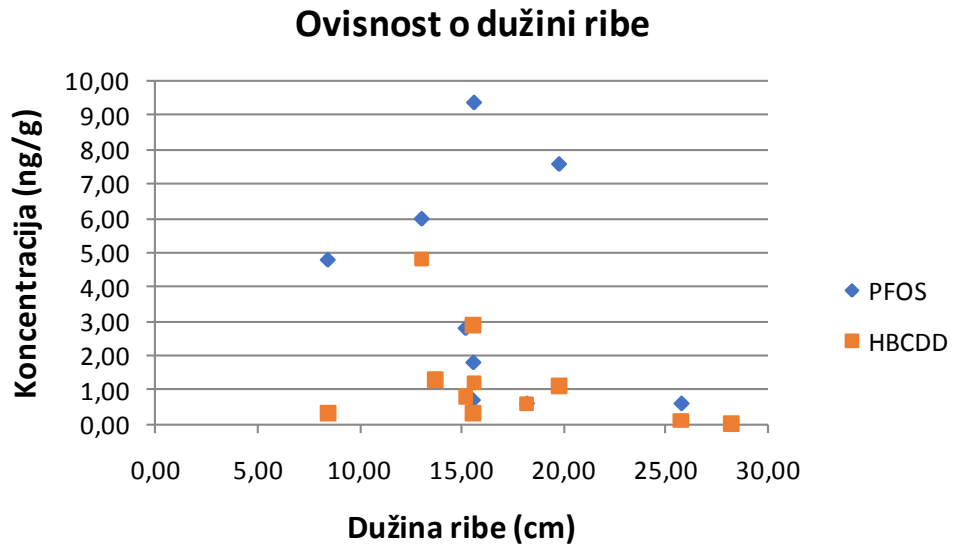
Vrlo sličan zaključak može se izvesti i na temelju mjerenja PFOS u ribama (slika 2.2.8.3.)



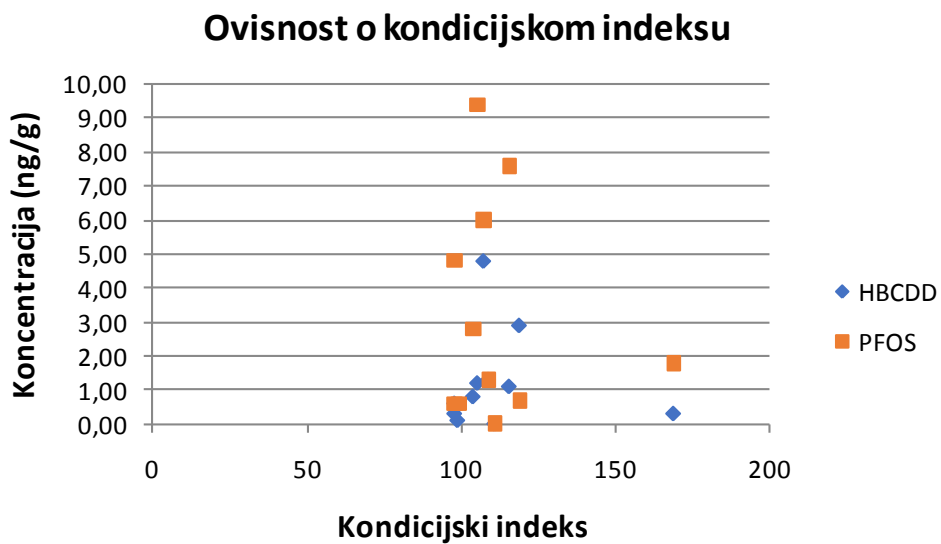
Slika 2.2.8.3. Raspodjela heksabromociklododekana (HBCDD) u slatkovodnim ribama raspoređenim prema vrstama i području uzorkovanja.

Jedan od mogućih razloga varijabilnosti koncentracija prioritarnih tvari u bioti su i biometrijski podatci. Međutim, taj utjecaj je uputno promatrati unutar jedne vrste da bi se izbjegle dvojbe oko razlika u trofičkom nivou ili nekim drugim specifičnim osobinama vrste. Budući da je samo klen vrsta koja je uzorkovana na više lokacija, korelacije su promatrane samo za tu vrstu.

Na Slikama 2.2.8.4. i 2.2.8.5. prikazane su korelacije koncentracija odabranih prioritarnih tvari (HBCDD i PFOS) s totalnom dužinom i kondicijskim indeksom klena. Kao što se vidi niti jedan od biometrijskih pokazatelja ne pokazuje značajan utjecaj na koncentracije praćenih prioritarnih tvari. U stvari, odnosi koji se vide na slikama više odražavaju karakteristike pojedinih lokacija u odnosu na antropogeni pritisak nego na dužinu ribe ili kondicijski indeks. Za detaljniju provjeru toga odnosa bila bi potrebna sustavna studija s mnogo više uzoraka iste ili vrlo slične vrste.



Slika 2.2.8.4. Ovisnost koncentracije odabranih prioriternih tvari u klenu o dužini ribe



Slika 2.2.8.5. Ovisnost koncentracije odabranih prioriternih tvari u klenu o kondicijskom indeksu ribe

3. RASPRAVA

3.1. Ocjena kemijskog stanja površinskih kopnenih voda obuhvaćenih u preliminarnom monitoringu tijekom 2017. godine

Ocjena kemijskog stanja na 18 mjernih postaja koje su obuhvaćene u preliminarnom monitoringu površinskih kopnenih voda temelji se na dobivenim rezultatima za prioritetne tvari koje su izmjerene u bioti tijekom 2017. godine (Tablica 3.1.1.). Prioritetne tvari izmjerene su u cijeloj ribi (živa, heksaklorbutadien, dikofol, heksabromociklododekan), u mišiću ribe (polibromirani difenileteri, heksaklorbenzen, perfluorooktan sulfonska kiselina i njezini derivati, dioksini i spojevi poput dioksina, heptaklor i heptaklorepoksid) te u beskralješnjacima, odnosno školjkašima i rakušcima (fluoranten i benzo(a)piren).

Iz rezultata preliminarnog monitoringa očigledno je da koncentracije nekoliko prioritetnih tvari u bioti prelaze definirane standarde kakvoće okoliša (SKVO) za biotu na većini postaja te je posljedično na svim postajama, osim na jednoj (Vransko jezero) utvrđeno nezadovoljavajuće kemijsko stanje. Na najviše postaja je kritična tvar Hg (16 od 18), slijedi PBDE (8 od 18), HC+HCE (4 od 18) i PFOS (1 od 18). Treba napomenuti da je ocjena usklađivanja sa SKVO za HC+HCE nepotpuna jer je granica detekcije korištene analitičke metode bila viša od SKVO. Zbog toga je moguće da je s obzirom na HC+HCE stanje nezadovoljavajuće na još većem broju postaja.

Nakon što se monitoring biote za prioritetne tvari počeo provoditi u zemljama Europske unije pokazalo se da su neke od definiranih SKVO vrijednosti (posebice za Hg i PBDE) tako niske da gotovo sva mjerenja u uzorcima slatkovodnih riba pokazuju višestruko veće koncentracije od SKVO vrijednosti za biotu te rezultiraju lošim kemijskim stanjem vodnih sustava (Fliedner i sur., 2016b, 2018; Eljarrat i Barcelo, 2018). Poseban problem je ocjena kemijskog stanja za HC+HCE za koje još nisu dostupne analitičke metode s odgovarajućom granicom detekcije pa prava ocjena stanja prema definiranoj SKVO nije moguća (Fliedner i sur., 2016a).

Tablica 3.1.1. Kritične prioritetne tvari u bioti na 18 mjernih postaja preliminarnog monitoringa tijekom 2017. godine i ocjena kemijskog stanja (PFOS- perfluorooktan sulfonska kiselina i njezini derivati, PBDE- polibromirani difenileteri, HC+HCE- heptaklor i heptaklorepoksid)

R. BR.	ŠIFRA	MJERNA POSTAJA	KEMIJSKO STANJE	
			STANJE	KRITIČNA TVAR
1.	10005	Sava, nizvodno od Slavenskog Broda	NIJE DOBRO	PBDE, Hg
2.	10010	Sava, Jasenovac, uzvodno od utoka Une	NIJE DOBRO	PBDE, Hg
3.	10016	Sava, Jankomir	NIJE DOBRO	Hg
4.	10017	Sava, Drenje-Jesenice	NIJE DOBRO	Hg, PFOS
5.	10019	Sava, Rugvica	NIJE DOBRO	PBDE, Hg
6.	12002	Bosut, Apševci	NIJE DOBRO	Hg
7.	15112	Akumulacija Pakra, Banova Jaruga	NIJE DOBRO	PBDE, Hg, HC+HCE
8.	19000	Plitvička jezera, Prošćansko jezero	NIJE DOBRO	Hg
9.	19001	Plitvička jezera, jezero Kozjak	NIJE DOBRO	PBDE, Hg
10.	21030	Akumulacija Borovik	NIJE DOBRO	PBDE, Hg
11.	21085	Bednja, Mali Bukovec	NIJE DOBRO	Hg
12.	29020	Dunav, Ilok - most	NIJE DOBRO	Hg
13.	29141	Drava, Legrad	NIJE DOBRO	PBDE, Hg, HC+HCE
14.	29210	Mura, Goričan	NIJE DOBRO	HC+HCE
15.	30120	Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	NIJE DOBRO	Hg
16.	40111	Cetina, Radmanove Mlinice	NIJE DOBRO	PBDE, Hg, HC+HCE
17.	40311	Vransko jezero, motel	DOBRO	
18.	40520	Baćinska jezera, Jezero Crniševo	NIJE DOBRO	Hg

U kratkom osvrtu na to kako zemlje članice EU mogu pristupiti problemu nedostizanju kriterija za SKVO za biotu za Hg (ali i za ostale prioritetne tvari) Vignati i sur. (2013) navode nekoliko opcija koje se mogu razmotriti: korištenje SKVO baziranom na koncentraciji Hg u vodi; mjerenje Hg u nižim organizmima, npr, školjkašima; ili definiranje nove lokalne SKVO vrijednosti za pojedinu zemlju ovisno o nivou Hg u ribama na pojedinom staništu (određivanje lokalnih bazičnih koncentracija). Međutim, u diskusiji autori odbacuju sve te tri ideje kao rješenje i predlažu da se počne provoditi prošireni monitoring za Hg (i ostale kritične prioritetne

tvare) 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 u bioti ili vremenskog okvira kada oni moraju biti postignuti. Tako je procijenjeno da nije za očekivati da će postavljeni kriterij za PBDE u bioti biti dosegnut do 2021. godine, kako je traženo u Okvirnoj direktivi o vodama (Eljatratt i Barcelo, 2018), premda višegodišnji trendovi u slatkovodnim ribama pokazuju smanjenje PBDE-ova u ribama nakon uvođenja zabrane njihovog korištenja 2004. godine.

4. ZAKLJUČCI I PREPORUKE

Rezultati preliminarnog monitoringa provedenog tijekom 2017. godine na 18 mjernih postaja u više različitih tipova površinskih kopnenih vodnih ekosustava (rijeka, akumulacije, jezera) koji su pod različitim stupnjem antropogenog pritiska, pokazali su nezadovoljavajuće kemijsko stanje u svim ispitivanim sustavima osim u Vranskom jezeru. To je uglavnom posljedica vrlo striktnih zahtjeva za nekoliko prioriternih tvari (Hg, PBDE) čije koncentracije u ribama prelaze definirane standarde kakvoće okoliša (SKVO) za biotu.

Ocjenu stanja i usporedbu pojedinih lokacija s obzirom na stupanj zagađenja otežava i ograničava dostupnost odgovarajućih organizama (prije svega beskralježnjaka za analizu PAH-ova), ali i činjenica da je potrebno analizirati različite vrste riba koje obitavaju u različitim vodnim tijelima i koje s obzirom na svoje karakteristike pokazuju različiti afinitet za akumulaciju prioriternih tvari. Zbog toga je važno poznavati ekološke i biometrijske karakteristike riba, a u slučaju organskih prioriternih tvari bilo bi nužno određivati i količinu masti u ribama.

Ovi preliminarni rezultati ukazuju da je potrebno sustavno provođenje monitoringa biote u površinskim kopnenim vodama prema unaprijed definiranom i standardiziranom monitoringu. Prema preporukama Okvirne direktive EU o vodama (EZ, 2014) za usporedbu različitih vodnih ekosustava u kojima se prioriterni tvari određuje u različitim vrstama riba moguće je koristiti normalizaciju na standardnu suhu masu, količinu masti i trofički nivo, međutim istraživanja su pokazala da takva normalizacija nije dostatna i da je za uočavanje trendova najvažnije provoditi visoko standardizirani višegodišnji monitoring (Fliedner i sur., 2016b). Osim toga, za provođenje normalizacije potreban je fond podataka za organizme (ribe) koje najčešće obitavaju u hrvatskim kopnenim vodama pa bi trebalo za te odabrane organizme provođenjem kontinuiranog višegodišnjeg monitoringa osigurati bazu podataka koji bi omogućavala prosudbu stupnja antropogenog utjecaja i usklađivanje sa zahtjevima Okvirne direktive EU o vodama (EC, 2000).

5. LITERATURA

- EC 2000, Direktiva 2000/60/EZ 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/EZ Europskog parlamenta i Vijeća o standardima kvalitete okoliša u području vodne politike
- EC 2014, CIS za Okvirnu direktivu o vodama, Upute br. 32. Uputa za monitoring biote unutar Okvirne direktive o vodama
- 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
- Eljarrat E, Barcelo D (2018) How do measured PBDE and HCB levels in river fish compare to the European Environmental Quality Standards? *Environmental Research* 160, 203–211
- Fliedner A, Lohmann N, Rudel H, Teubner D, Wellmitz J, Koschorreck J (2016a) Current levels and trends of selected EU Water Framework Directive priority substances in freshwater fish from the German environmental specimen bank. *Environmental Pollution* 216, 866–876
- Fliedner A, Rüdell H, Teubner D, Buchmeier G, Lowis J, Heiss C, Wellmitz J, Koschorreck J (2016b) Biota monitoring and the Water Framework Directive- can normalization overcome shortcomings in sampling strategies? *Environmental Science and Pollution Research* 23, 21927–21939
- Fliedner A, Rüdell H, Lohmann N, Buchmeier G, Koschorreck J (2018) Biota monitoring under the Water Framework Directive: On tissue choice and fish species selection. *Environmental Pollution* 235, 129–140
- Hrvatske vode (2013.-2017.) Godišnja Izvješća o stanju površinskih voda u Republici Hrvatskoj
- Karlsson M (2015) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater snails of family Lymanidae from Patholmsviken. Project in Chemistry: 15 HP, Örebro University, pp 68
- 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

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