



Adresa: Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb | Tel: +385 (0)1 4561 111 | Fax: +385 (0)1 4680 084 |  
www.irb.hr

## Izvešće – Procjena i revizija postojećih standarda kakvoće vodenog okoliša za specifične onečišćujuće tvari: arsen, bakar, cink, krom i njihovi spojevi

Naručitelj:	Hrvatske vode, Ul. grada Vukovara 220, Zagreb
Ugovor br.:	34-069/16
Zajednica izvršitelja:	Vodeći član: Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Bijenička c. 54; OIB 69715301002 – zastupan po v.d. ravnatelju dr. sc. Stjepko Fazinić Drugi član: Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Ul. cara Hadrijana 8a; OIB 78808975734 – zastupano po koordinatoru projektnih aktivnosti dr. sc. Tvrtku Smital

<b>Koordinator stručnog izvješća:</b>	
dr. sc. Tvrtko Smital, znanstveni savjetnik: 	Institut Ruđer Bošković, Zagreb – Zavod za istraživanje mora i okoliša
<b>Suautori Stručnog izvješća:</b>	
dr. sc. Branimir Hackenberger Kutuzović, izv. prof.: 	Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
dr. sc. Rozelindra Čož Rakovac, znanstvena savjetnica: 	Institut Ruđer Bošković, Zagreb – Zavod za kemiju materijala

U Zagrebu, listopad 2017.

v.d. ravnatelj Instituta Ruđer Bošković:




## 1. Uvod

Na temelju sklopljenog Ugovora (Vaša oznaka 34-069/16) od 09.12.2016. god. za izvršavanje projektnog zadatka vezanog uz nabavu procjene i revizije postojećih standarda kakvoće vodenog okoliša (SKVO) za specifične onečišćujuće tvari: arsen, bakar, cink, krom i njihovi spojevi, stručnjaci iz Instituta Ruđer Bošković (IRB) i Odjela za biologiju Sveučilišta u Osijeku, kao zajednički ponuditelji, izvršili su odgovarajuća eksperimentalna istraživanja, načinili komparativnu analizu dostupne literature i postojećih SKVO za predmetne tvari te stoga dajemo preporuku za afirmaciju i primjenu odgovarajućih SKVO vrijednosti.

U skladu s principima opisanim u Projektnom zadatku, sustavno praćenje koncentracija onečišćujućih tvari u različitim sastavnicama vodenog okoliša jedan je od ključnih preduvjeta za postizanje i/ili održavanje odgovarajućeg ekološkog i kemijskog statusa. Standardi kakvoće vodenog okoliša (SKVO; engl. *Environmental Quality Standards* – EQS) pri tome se određuju kao vrijednosti definirane odgovarajućom nacionalnom i/ili međunarodnom regulativom, a kojom se propisuju maksimalne dozvoljene koncentracije specifičnih i potencijalno štetnih tvari u uzorku iz okoliša. Pod vodnim okolišem u tom smislu podrazumijevaju se površinske vode, uključivo i priobalne vode i teritorijalno more te podzemne vode.

Za tzv. prioritetne (osnovne) onečišćujuće tvari u vodnom okolišu na razini Europske unije (EU), Republika Hrvatska je temeljem odgovarajućih direktiva EU (1) preuzela definirane SKVO vrijednosti kao osnovu za postizanje, odnosno održavanje dobrog kemijskog statusa vodnih tijela. Na temelju nacionalnog Zakona o vodama (2) Vlada Republike Hrvatske je 2013. god. donijela i odgovarajuću Uredbu o standardu kakvoće voda (3). Pored niza drugih elemenata i standarda od kritične važnosti za održivo upravljanje vodnim okolišem, Uredbom su propisani i SKVO za površinske vode, uključivo i priobalne vode i teritorijalno more te podzemne vode.

U okviru predmetne regulative zemlje članice EU sukladno zahtjevima Okvirne direktive o vodama (ODV) moraju osim propisanih 45 prioritetnih opasnih tvari s definiranim SKVO vrijednostima, identificirati i pratiti koncentracije tzv. specifičnih onečišćujućih tvari, te za iste razviti SKVO. Pri tome se pod pojmom specifičnih onečišćujućih tvari podrazumijevaju one tvari, ili grupe tvari, koje zbog specifičnosti vezanih uz karakter antropogenog utjecaja (odgovarajući tip i/ili intenzitet gospodarskih i industrijskih aktivnosti, prometa, specifične hidrološke prilike u odnosu na te aktivnosti i sl.), ili uslijed prirodnih geokemijskih specifičnosti područja, za neku državu predstavljaju potencijalnu opasnost koja nije odgovarajuće obuhvaćena praćenjem osnovnih onečišćujućih tvari zajednički definiranih na razini EU. Indikativna lista takvih tvari navedena je u ODV (Aneks VIII). Usklađenost sa SKVO vrijednostima za pojedine onečišćujuće tvari sastavni je dio procjene ekološkog stanja, a specifične onečišćujuće tvari zajedno s fizikalno-kemijskim i biološkim elementima kakvoće doprinose klasifikaciji ekološkog statusa.

S obzirom na prethodno navedeno, zemlje članice obvezne su regulatornim tijelima na razini EU obrazložiti svoju listu specifičnih onečišćujućih tvari, za tvari definirati odgovarajuće SKVO vrijednosti, te u konačnici implementirati program praćenja koncentracija tih tvari u vodnom okolišu.

SKVO (EQS) vrijednosti za potencijalno štetne tvari određuju se temeljem jasno definiranog postupka opisanog u odgovarajućim stručnim dokumentima usvojenim na razini EU (4). Ukratko, određivanje SKVO vrijednosti temelji se na određivanju L(E)C50 (koncentracija testne tvari pri kojoj je zabilježena smrtnost 50 % testnih organizama, ili 50 % intenziteta mjenog

učinka), odnosno PNEC (engl. *Predicted No Effect Concentration*) vrijednosti za akutnu i/ili kroničnu toksičnost, temeljem istraživanja koja moraju biti provedena:

- a) na dobro definiranim modelnim pokusnim organizmima;
- b) međunarodno standardiziranim biološkim testovima toksičnosti, te
- c) korištenjem modelnih organizama koji uključuju različite taksonomske kategorije.

Osnovne taksonomske skupine pri tome moraju minimalno uključivati alge ili makrofite, slatkovodne ili morske planktonske rakove ili odgovarajuće reprezentativne organizme za slane vode, te ribe. Ovisno o razini i broju provedenih testova akutne i/ili kronične toksičnosti, predložene SKVO vrijednosti izvode se uz dodatnu sigurnosnu korekciju dobivenih L(E)C50 i/ili PNEC vrijednosti odgovarajućim faktorima sigurnosti (*assessment factor*; AF).

Uredbom o standardu kakvoće voda (3) Republika Hrvatska preuzela je i obvezu praćenja ukupno 7 kategorija specifičnih onečišćujućih tvar. To su: arsen, bakar, cink, krom i njihovi spojevi, fluoridi, organski vezani halogeni koji se mogu adsorbirati (AOX) te poliklorirani bifenili (PCB). Za neke od ovih tvari u Uredbi su dani i podaci o prosječnim godišnjim koncentracijama dobiveni temeljem dosadašnjih mjerenja u kopnenim i ostalim površinskim vodama, dok je vjerodostojne SKVO vrijednosti tek potrebno utvrditi primjenom propisanog postupka (4).

Stoga smo temeljem sklopljenog Ugovora izvršili odgovarajuća istraživanja usmjerena definiranju SKVO vrijednosti za tražene 4 kategorije specifičnih onečišćujućih tvari, u skladu s opisanim međunarodnim i nacionalnim smjernicama, direktivama i strateškim dokumentima.

## **2. Cilj i svrha Projekta**

Cilj predloženog istraživanja bilo je odrediti SKVO vrijednosti za dio tvari koje su u okviru Uredbe o standardu kakvoće voda kategorizirane kao specifične onečišćujuće tvari. Ciljne tvari za ovu studiju bili su metali, i to specifično:

- arsen i njegovi spojevi;
- bakar i njegovi spojevi;
- cink i njegovi spojevi, te
- krom i njegovi spojevi.

Predmetno istraživanje proveli smo u skladu s postupkom opisanim u odgovarajućem tehničkom EU dokumentu (4). Izvedene i predložene SKVO vrijednosti potom smo temeljili na rezultatima dobivenim primjenom tri akutna testa toksičnosti: na algama, slatkovodnim planktonskim račićima, te embrijima riba, uz dodatne uvide u okviru dostupne literature.

## **3. Opis Projekta i metodološka podloga**

U projektu smo odredili, odnosno predložili SKVO vrijednosti za metale i njihove spojeve opisane u poglavlju 4. Pri tome smo slijediti propisani postupak i proveli odgovarajuću studiju koja je specifično uključivala:

- Pregled međunarodno raspoloživih podataka o temeljnim fizikalno-kemijskim svojstvima, primjeni, procijenjenim koncentracijama u okolišu, ponašanju u okolišu, regulatornim standardima, te (eko)toksičnosti testnih tvari;

- Određivanje letalne toksičnosti (odnosno inhibicije rasta pokusnih modelnih organizama) unutar širokog raspona koncentracija za sve testne tvari, uz odgovarajuću razinu reproducibilnosti rezultata (najmanje tri nezavisna pokusa za svaki test) i statistički vjerodostojno izvođenje L(E)C50/PNEC vrijednosti;
- Korištenje tri testa akutne toksičnosti koji su uključivali različite modelne organizme, odnosno taksonomske skupine, i to:
  - a) određivanje akutne/kronične toksičnosti AlgalTox testom mjerenjem inhibicije rasta slatkovodnih jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5);**
  - b) određivanje akutne toksičnosti mjerenjem smrtnosti slatkovodnog planktonskog račića *Daphnia sp.* (6);**
  - c) određivanje akutne toksičnosti mjerenjem smrtnosti ribljih embrija vrste zebrića (*Danio rerio*) (7);**
- Konačni obrazloženi prijedlog SKVO vrijednosti za sve testne tvari izveden temeljem dobivenih L(E)C50/PNEC vrijednosti i korigiran za odgovarajuće faktore procjene (AF);
- Prijedlog eventualnih dodatnih istraživanja u svrhu mogućih unaprjeđenja, odnosno korekcija SKVO vrijednosti.

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>Arsen i njegovi spojevi – sažetak</b>	<b>8</b>
<b>1.1.</b>	<b>Rezultati</b>	<b>10</b>
1.1.1.	Identitet	10
1.1.2.	PNEC vrijednosti predložene za izvođenje SKVO	10
1.1.3.	Klasifikacija opasnosti	10
1.1.4.	Fizikalna i kemijska svojstva	10
1.1.5.	Prisustvo i sudbina arsena u okolišu	11
1.1.6.	Dostupni podaci o (eko)toksičnosti arsena	12
1.1.7.	Mehanizam toksičnosti arsena i njegovih spojeva	13
<b>1.2.</b>	<b>Izvođenje SKVO za arsen</b>	<b>14</b>
1.2.1.	Korištenje metode dodatnog pristupa riziku (engl. <i>added risk approach</i> )	14
<b>1.3.</b>	<b>Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenje SKVO za arsen</b>	<b>15</b>
1.3.1.	Pozadinske (okolišne) koncentracije arsena u RH	15
1.3.2.	PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje	16
1.3.3.	PNEC za slatkovodne sustave – kronično izlaganje	23
1.3.4.	PNEC za morske vode	23
<b>1.4.</b>	<b>Analiza i monitoring</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Bakar i njegovi spojevi – sažetak</b>	<b>26</b>
<b>2.1.</b>	<b>Rezultati</b>	<b>28</b>
2.1.1.	Identitet	28
2.1.2.	PNEC vrijednosti predložene za izvođenje SKVO za bakar	28
2.1.3.	Klasifikacija opasnosti	29
2.1.4.	Fizikalna i kemijska svojstva	29
2.1.5.	Prisustvo i sudbina bakra u okolišu	29
2.1.6.	Dostupni podaci o (eko)toksičnosti bakra	31
2.1.7.	Mehanizam toksičnosti bakra i njegovih spojeva	32
<b>2.2.</b>	<b>Izvođenje SKVO za bakar</b>	<b>33</b>
2.2.1.	Korištenje metode dodatnog pristupa riziku (engl. <i>added risk approach</i> )	33
<b>2.3.</b>	<b>Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenje SKVO za bakar</b>	<b>34</b>
2.3.1.	Pozadinske (okolišne) koncentracije bakra u RH	34
2.3.2.	PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje	34
2.3.3.	PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje	38

2.3.4.	PNEC za morske vode	39
<b>2.4.</b>	<b>Analiza i monitoring</b>	40
<b>3.</b>	<b>Cink i njegovi spojevi – sažetak</b>	41
<b>3.1.</b>	<b>Rezultati</b>	43
3.1.1.	Identitet	43
3.1.2.	PNEC vrijednosti kao temelj za izvođenje SKVO za cink	43
3.1.3.	Klasifikacija opasnosti	44
3.1.4.	Fizikalna i kemijska svojstva	44
3.1.5.	Prisustvo i sudbina cinka u okolišu	44
3.1.6.	Dostupni podaci o (eko)toksičnosti	45
3.1.7.	Mehanizam toksičnosti cinka i njegovih spojeva	46
<b>3.2.</b>	<b>Izvođenje SKVO za cink</b>	47
3.2.1.	Korištenje metode dodatnog pristupa riziku (engl. <i>added risk approach</i> )	47
<b>3.3.</b>	<b>Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenje SKVO za cink</b>	47
3.3.1.	PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje	48
3.3.2.	PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje	52
3.3.3.	PNEC za morske vode	53
<b>3.4.</b>	<b>Analiza i monitoring</b>	54
<b>3.5.</b>	<b>Zaključci i napomene</b>	55
<b>4.</b>	<b>Krom i njegovi spojevi – sažetak</b>	56
<b>4.1.</b>	<b>Rezultati</b>	59
4.1.1.	Identitet	59
4.1.2.	PNEC vrijednosti predložene za izvođenje SKVO za krom	59
4.1.3.	Klasifikacija opasnosti	60
4.1.4.	Fizikalna i kemijska svojstva	60
4.1.5.	Prisustvo i sudbina kroma u okolišu	61
4.1.6.	Dostupni podaci o (eko)toksičnosti kroma	62
4.1.7.	Mehanizam toksičnosti kroma i njegovih spojeva	63
<b>4.2.</b>	<b>Izvođenje SKVO za krom i njegove spojeve</b>	64
<b>4.3.</b>	<b>Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenje SKVO za krom</b>	64
4.3.1.	Pozadinske (okolišne) koncentracije kroma u RH	64
4.3.2.	PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje	64
4.3.3.	PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje	71
4.3.4.	PNEC za morske vode	72

<b>4.4.</b>	<b>Analiza i monitoring</b>	<b>74</b>
<b>4.5.</b>	<b>Dodatne napomene</b>	<b>74</b>
<b>5.</b>	<b>Završni zaključci i preporuke</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Važnija literatura</b>	<b>77</b>

## 1. Arsen i njegovi spojevi – sažetak

Arsen (As) je element koji je prirodno prisutan u vodenim ekosistemima, ali u okoliš također dolazi i putem antropogenih aktivnosti. U aerobnim uvjetima uglavnom je prisutan u peterovalentnom obliku kao As(V) koji dominira u odnosu na termodinamički manje stabilan trovalentni oblik As(III). Arsin (oksidacijsko stanje -3) i elementarni As u prirodi se mogu naći samo u jako reducirajućim uvjetima i vrlo rijetko se pojavljuju u površinskim vodama.

U pogledu molekularnih mehanizama toksičnosti As(III) djeluje vezanjem na sulfhidrilne skupine proteina, dok As(V) natječući se s fosforom utječe na oksidativnu fosforilaciju. I anorganski i organski oblici arsena mogu uzrokovati različite štetne učinke koji variraju od akutne letalnosti do kroničnih učinaka kao što je rak. Stupanj toksičnosti arsena tipično ovisi o obliku (npr. anorganskom ili organskom) i oksidacijskom stanju vrsta arsena. Anorganski arsenici toksičniji su od organskih, a unutar tih dvaju razreda trovalentni oblici su toksičniji od pentavalentnih vrsta. Arsen i njegovi spojevi štetno utječu na nekoliko različitih organskih sustava, uključujući kožu, respiratorne i kardiovaskularne organe, imunološki, reproduktivni, probavni i živčani sustav. Vodeni i kopneni organizmi pokazuju širok raspon osjetljivosti na razne vrste arsena, a na osjetljivost kritično utječu biološki i abiotički čimbenici.

Kada su u pitanju elementi kao što je arsen, a koji imaju prirodno značajne pozadinske koncentracije u okolišu, neovisno o antropogenom utjecaju, preporuka je za određivanje SKVO vrijednosti koristiti tzv. metodu dodanog rizika (engl. *added risk approach*). U ovom pristupu i predviđena koncentracija u okolišu (PEC vrijednost) i predviđena koncentracija koja nema toksičnog učinka (PNEC vrijednost) određuju se na temelju dodane koncentracije, u ovom slučaju arsena prisutnog u okolišu, što u konačnici rezultira tzv. "dodanim PEC" (PECadd), odnosno "dodanim PNEC" (PNECadd) vrijednostima. Prema tome, metoda dodanog rizika, koja se u načelu može koristiti za sve prirodne tvari, podrazumijeva da su samo antropogeni dodaci ispitivane tvari (tj. količina dodana na prirodnu pozadinsku koncentraciju) relevantni za procjenu učinka te tvari. U skladu s tim postavkama, maksimalna dopuštena koncentracija (engl. *maximum permissible concentration*; MPC) u vodenom okolišu treba biti zbroj lokalne, prirodne ili pozadinske koncentracije ispitivane tvari i izvedene PNECadd, odnosno SKVO vrijednosti. Ovo je za svrhu ovog Izvještaja osobito važno za arsen, jer iako su prema službenim podacima prosječne godišnje koncentracije arsena u vodama u RH na razini manjoj od 10 µg/L, postoje područja koja uslijed geoloških karakteristika sadrže značajno više koncentracije As u podzemnoj, odnosno površinskoj vodi, posebice u Istočnoj Slavoniji i vodnom području sliva Drave i Dunava.

Podaci o (eko)toksičnosti arsena, odnosno njegovih spojeva su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih toksikoloških online baza i izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih organizacija. Dostupni su podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti za različite taksonomske skupine slatkovodnih i morskih organizama. S obzirom na dostupne literaturne podatke alge se pojavljuju kao najosjetljivija taksonomska skupina u odnosu na ekotoksičnost arsena i/ili njegovih spojeva. Postojeći podaci u velikoj mjeri poklapaju se s našim istraživanjima obavljenima u okviru ove studije. Pri tome smo analizirali akutni učinak arsena u tro- i peterovalentnom oksidacijskom stanju, iako je u dobro oksigeniranoj vodi i sedimentima gotovo sav arsen prisutan u termodinamički stabilnom pentavalentnom stanju (arsenat). Naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su alge uistinu najosjetljiviji organizmi



na toksičnost arsena. Najniža dobivena EC50 vrijednost za jednostanične zelene alge vrste *Scenedesmus subspicatus* iznosila je 95.05 µg/L za As(III), odnosno 119.2 µg/L za As(V).

U skladu s ovim podacima, te uzimajući u obzir činjenicu da je za procjenu SKVO vrijednosti za vodeni okoliš termodinamički stabilan As(V) (arsenat) (eko)toksikološki puno relevantniji od As(III) vrsta, PNECadd vrijednost za slatkovodne sustave i akutnu izloženost arsenu i/ili njegovim spojevima temeljimo na najnižoj EC50 vrijednosti od 119.2 µg/L ustanovljenoj za algu *S. subspicatus* za As(V). Osim toga, s obzirom da dostupni literaturni podaci jasno pokazuju da su alge također među najosjetljivijim organizmima kada je u pitanju dugoročna izloženost, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne EC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost.

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti oslonili smo se na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost za slatkovodne organizme. Nadalje, kako se slatke i slane vode značajno razlikuju u pogledu različitih abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata, preporuka je da se za metale i metaloide ne kombiniraju podaci o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme. Stoga, kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti i u ovom slučaju uzeli smo raspoloživu podatke iz znanstvene literature, kao i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama arsenu i/ili njegovim spojevima.

Cjeloviti pregled preporučenih SKVO vrijednosti za arsen i njegove spojeve donosimo u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sažetak preporučenih SKVO vrijednosti za arsen i njegove spojeve.

Vodeni medij	Predložena PNEC (SKVO) vrijednost (µg/L)	
	akutna (kratkotrajna) izloženost	kronična (dugotrajna) izloženost
Slatke vode	12	0.5
Morske vode	1.1	0.6

U pogledu metodoloških zahtjeva vezanih uz analizu i monitoring arsena i njegovih spojeva, te s obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije arsena u morskoj vodi 0.5 µg/L, odnosno da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti raspoloživih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da su standardne metode koje su danas na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.

## 1.1. Rezultati

### 1.1.1. Identitet

U Tablici 2. navedeno je kemijsko ime i CAS (*Chemical Abstract Service*) broj tvari koja je testirana, odnosno za koju su predloženi odgovarajuće SKVO vrijednosti temeljem ovog izvještaja.

**Tablica 2.** Tvar na koju se odnosi predmetni izvještaj u ovom poglavlju je arsen (As), testiran u trovalentnom ( $\text{NaAsO}_2$ ) i peterovalentnom ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) oksidacijskom stanju.

Ime (kemijska oznaka)	CAS broj
Arsen (As)	7440-38-2
Natrij arsenit ( $\text{NaAsO}_2$ )	7784-46-5
Bi-natrij hidrogen arsenat heptahidrat ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	10048-95-0

### 1.1.2. PNEC vrijednosti kao temelj za izvođenje SKVO vrijednosti

U skladu s postojećim znanstvenim spoznajama i metodološkim postupcima opisanima u Tehničkom priručniku (*Technical Guidance Document*; u daljnjem tekstu TGD, 4) izdanom od strane Europske agencije za kemikalije (*European Chemicals Agency*; ECHA), temelj za izvođenje SKVO vrijednosti predloženih u ovom izvještaju su PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) vrijednosti dobivene korištenjem tri testa akutne toksičnosti koji su uključivali različite modelne organizme, odnosno taksonomske skupine, kao što je opisano u poglavlju 3.

Pri tome je važno napomenuti da se PNEC vrijednosti za arsen odnose na „dodane“, pozadinske koncentracije otopljenog arsena na koncentracije koje su normalno prisutne u prirodnim vodama. Nadalje, iako bioraspoloživost i posljedična toksičnost arsena može biti modificirana različitim promjenama u vodi (pH, tvrdoća vode, otopljena organska tvar i sl.) ili kemijskim svojstvima sedimenta, usprkos vrlo obimnim istraživanjima dostupnim u svjetskoj literaturi do sada nema jednoznačnog zaključka o statistički značajnom utjecaju tih pokazatelja na (eko)toksičnost arsena (8). Stoga ovi pokazatelji nisu dodatno uzimani u obzir prilikom izvođenja SKVO vrijednosti.

### 1.1.3. Klasifikacija opasnosti

U Tablici 3. dani su podaci i međunarodno prihvaćene klasifikacijske oznake rizika za arsen.

**Tablica 3.** Klasifikacija rizika za arsen.

R-oznake i označavanje	Literatura
Arsen, metal; T; R23/25 - N; R50-53	9

### 1.1.4. Fizikalna i kemijska svojstva

U Tablici 4. navedena su ključna fizikalno-kemijska svojstva arsena.

**Tablica 4.** Fizikalno-kemijska svojstva arsena.

Svojstvo	Vrijednost	Literatura
Molekularna (kemijska) oznaka	As	
Tlak para	7.5 x 10 <sup>-3</sup> mmHg pri 280°C	10
Topivost u vodi	netopiv (kao metal)	10
Relativna molekulska masa	74.92	11

#### 1.1.5. Prisustvo i sudbina arsena u okolišu

Podaci o pojavnosti, abiotičkoj sudbini i specijaciji arsena u okolišu iznimno su brojni i u narednim odlomcima donosimo sažeti pregled podataka relevantnih za ovaj Izvještaj.

Abiotička sudbina – arsen i njegovi spojevi javljaju se u kristaliničnom prahu, te kao amorfni ili staklasti oblici. Obično se javljaju u tragovima u svim stijenama, tlu, vodi i zraku (12, 13);

Specijacija u okolišu – arsen može postojati u četiri oksidacijska stanja: -3, 0, +3 i +5. Elementarni arsen i arsine (-3) mogu postojati samo u jako reducirajućim uvjetima okoliša. Kao slobodni element (oksidacijsko stanje 0) rijetko se susreće u prirodnim vodama. Topivi anorganski arsenat (oksidacijsko stanje +5) prevladava, jer je termodinamički stabilniji od arsenita (oksidacijsko stanje +3) (13). U dobro oksigeniranoj vodi i sedimentima gotovo je sav arsen prisutan u termodinamički stabilnom pentavalentnom stanju (arsenat). Neke arsenitne i arsenatne vrste mogu izmjenjivati oksidacijsko stanje ovisno o redoks potencijalu (Eh), pH i biološkim procesima. Ostali oblici otopljenog arsena koji mogu biti prisutni u vodenom stupcu uključuju monometilarsonsku kiselinu (MMA) i dimetilarsinsku kiselinu (DMA). Oba stanja su uglavnom izvedena iz biometilacije anorganskog arsena vodenim algama (osobito prijelaznim vodama). Unutar viših organizama (npr. riba i rakova), prevladava organoarsen arsenobetain;

Fotosjetljivost – Stope fotokemijske razgradnje arsenita, DMA i MMA u vodi dobro su proučavane. Sve ove kemijske vrste brzo se razgrađuju u oksigeniranoj destiliranoj vodi, dok se sporija degradacija javlja u de-aeriranim otopinama i morskoj vodi. Poluživot za degradaciju DMA, MMA i arsenita je 9.2, 11.5, odnosno 0.9 minuta u aeriranoj destiliranoj vodi te 25, 19, odnosno 8 minuta u de-aeriranoj destiliranoj vodi (13);

Distribucija u sustavima voda/sediment – distribucija i raspodjela arsena u vodi ovisi o kemijskom obliku arsena i interakciji s drugim prisutnim mineralima. Distribucija i transport arsena u sedimentu je složen proces, ovisan o stanju oksidacije, kakvoći vode, prisustvu nativnih bakterija i tipu sedimenta. I adsorpcija arsena na oksidima bogatim željezom na površini sedimenata i ugradnja arsena u sedimente koprecipitacijom s vodikovim oksidima su faktori koji kritično utječu na mobilizaciju arsena u sedimentu. Osim toga, opseg adsorpcije i remobilizacije arsenovih spojeva tijekom interakcije vode i sedimenta varira s oksidacijskim stanjem, temperaturom, Eh i pH vode. Opseg i brzina adsorpcije arsenata smanjuje se s povećanjem temperature od 20 do 40°C. Nadalje, količina adsorbiranog arsenata povećava se s povećanjem pH sustava. Izlijevanje se ne čini značajnim putem gubitka arsenata iz tla, budući da se mnoge vrste arsena obično adsorbiraju u tlu (13);

Stupanj degradacije u tlu – spojevi arsena mogu se metabolizirati bakterijama prisutnim u tlu na alkilarsine, MMA i arsenat. Mnogi organizmi tla sposobni su metabolizirati arsen, te će posljedično reducirajuće vrste arsena (uglavnom metilirani arsini kao što su MMA i DMA)

ispariti iz tla. Poluživot DMA u tlu iznosi oko 20 dana. Uklanjanje arsena iz porne vode tla može se događati i kao posljedica precipitacije;

Prirodne koncentracije arsena u okolišu – Uobičajeno su koncentracije arsena u morskoj vodi otvorenog oceana u rasponu od 1-2 µg/L. Arsen je široko rasprostranjen u površinskim slatkovodnim vodama, a koncentracije u rijekama i jezerima uglavnom su ispod 10 µg/L, iako pojedini uzorci mogu varirati i do 5 mg/L u blizini antropogenih izvora. Razina arsena u podzemnim vodama prosječno je oko 1-2 µg/L, osim u područjima s vulkanskom stijenama i mineralnim naslagama sumpora gdje razina arsena može varirati do 3 mg/L. Srednje koncentracije arsena u sedimentima kreću se od 5 do 3.000 mg/kg, s višim razinama koje se javljaju u područjima antropogenog onečišćenja (13);

Biološka transformacija – većina biotransformacija arsenovih vrsta javlja se u tlu, u sedimentima, biljkama i životinjama, te u zonama biološke aktivnosti u oceanu. Biometilacija i bioredukcija su vjerojatno najvažniji putevi i mehanizmi biotransformacije arsena. Pod aerobnim uvjetima miješane mikrobne kulture jezerskih sedimenata mogu smanjiti arsenat (dominantan oblik arsena u vodi) do arsenita i raznih metiliranih arsenikala, i također oksidirati arsenit u arsenat. U anaerobnim uvjetima, međutim, događa se samo redukcija (13);

Particijski koeficijenti – razmjer adsorpcije arsena (Kp) jako ovisi o pH vode, oksidacijskom stanju i temperaturi. U kiseloj i neutralnoj vodi As(V) je snažno adsorbiran, dok je As(III) relativno slabo adsorbiran (14). U vodama s visokim pH, Kp vrijednosti su znatno niže za oba oksidacijska stanja, tako da je:

- Log Kp (sediment/voda) – procijenjena vrijednost 3.82
- Log Kp (partikularne čestice/water) – procijenjena vrijednost 4.00 (15);

Bioakumulacija i biokoncentracija – među relativno ograničenim brojem studija bioakumulacije i biokoncentracije arsena u vodenom okolišu ističe se nekoliko istraživanja i posljedično određenih biokoncentracijskih faktora (BCF) za arsen. Akumulacija trovalentnog i pentavalentnog arsena u zelenoj algi vrste *Chlorella vulgaris* bila je istraživana u algi koje su bile izolirane iz okoliša s visokom koncentracijom arsena. Određene BCF vrijednosti pri tome su se kretale od 1.4 do 330, s koncentracijama izlaganja od 0 do 10.000 mg/L (16). U jednoj drugoj studiji, srednje koncentracije arsena u uzorcima insekata sakupljenim iz Crvene rijeke (US) bila je 0.12, odnosno 0,5 µg/g suhe mase arsena, što približno odgovara BCF od 0.06, odnosno 0.04. Pri tome je izmjerena koncentracija arsena u rijeci bila 14 µg/L (17).

Većina istraživanja usmjerenih određivanju SKVO vrijednosti sadrži samo ograničene podatke o bioakumulaciji, a pri tome većina podataka dolazi od uzoraka prikupljenih *in situ*. Općenito, na temelju ovih istraživanja može se zaključiti da su BCF morskih vrsta znatno viši nego kod slatkovodnih vrsta, dok su laboratorijski istraživane BCF vrijednosti prijavljene za različite vrste slatkovodnih riba ispod 1. Samo jedan prihvatljiv test biokoncentracije s morskom vrstom naveden je u publikaciji Američke agencije za zaštitu okoliša (US EPA) o arsenu. Određeni BCF bio je 350, a dobiven je istraživanjem na školjkašu vrste *Crassostrea virginica* (18, 19, 20).

#### 1.1.6. Dostupni podaci o (eko)toksičnosti arsena

Podaci o (eko)toksičnosti arsena su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih baza (osobito EPA ECOTOX baza, <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> te TOXNET baza, <https://toxnet.nlm.nih.gov/>) i izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih

organizacija. Najvažniji i najkompletniji podaci mogu se naći u javno dostupnim publikacijama, a pri tome su za svrhu ovog Izvješća najvažniji slijedeći izvori:

- Water Research Commission Report No. DoE 2633/1, 1992 (18);
- Water Research Commission Proposed EQS for List II substances in water: arsenic. TR 212, 1984 (15);
- World Health Organization (WHO) Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds, 2001 (13);
- US EPA Ambient Water Quality Criteria for Arsenic, 1984 (19).

Navedeni izvori upotpunjeni su pretraživanjem najnovije znanstvene literature (putem Web of Science i Scopus baza podataka) i preglednih znanstvenih publikacija vezanih uz ekotoksičnost arsena i njegovih spojeva (21, 22).

Najkompletniji pregled dosadašnjih istraživanja o ekotoksičnosti arsena i njegovih spojeva, uz preglednu evaluaciju studija načinjenih do 2007. god., dostupan je u predmetnom izvješću UK Environment Agency (8). Studije i istraživanja koje su publicirane u međuvremenu nisu rezultirale nekim značajno novim saznanjima, stoga za detaljniji pregled upućujemo posebno na tu publikaciju. Za svrhu ovog Izvješća ukratko ćemo navesti najvažnija saznanja o toksičnosti arsena, odnosno njegovih spojeva, za slatkovodne i morske organizme.

Toksičnost za slatkovodne organizme – dostupni su podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti za različite taksonomske skupine, uključujući alge, makrofite, rakove, ribe, insekte, mekušce, vodozemce, kolnjake, protozoe i bakterije. Rakovi, alge i ribe su najosjetljiviji organizmi u odnosu na kroničnu izloženost. Alge i rakovi također su najosjetljiviji na akutno izlaganje arsenu, odnosno njegovim spojevima, a u osjetljive skupine spadaju i vodozemci i kukci (8).

Toksičnost za morske organizme – dostupni su podaci o kroničnim i akutnim toksičnim učincima na alge, rakove, ribe, mekušce, kolutičavce i bodljikaše. Bodljikaši, mekušci i alge su najosjetljiviji organizmi kada je u pitanju kronična izloženost, dok su alge i bodljikaši također najosjetljiviji i na akutnu izloženost arsenu. Istraživanje ukazuje da rakovi mogu biti relativno osjetljivi na izloženost arsenu i njegovim spojevima (8).

#### 1.1.7. Mehanizam toksičnosti arsena i njegovih spojeva

Iz brojnih dostupnih istraživanja i izvora navedenih u prethodnom poglavlju jasno je da se i pentavalentni i trovalentni topivi spojevi arsena brzo i opsežno apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu izloženih organizama. Pri tome je u mnogim vrstama metabolizam arsena karakteriziran s dva glavna tipa reakcija:

- reakcije redukcije pentavalentnog do trovalentnog arsena;
- oksidacijske i metilacijske reakcije u kojima su trovalentni oblici arsena uzastopno metilirani tako da tvore mono-, di- i trimetilirane produkte.

Metilacija anorganskog arsena olakšava izlučivanje arsena iz tijela putem urina. Postoje velike kvalitativne i kvantitativne razlike među tipovima metilacijskih reakcija u sisavaca, do te mjere da neke vrste pokazuju minimalnu ili potpuno odsustvo arilne metilacije (npr. majmun

marmozet, zamorac, čimpanza). Međutim, kod ljudi se anorganski arsen učinkovito metilira i metaboliti se izlučuju prvenstveno u urinu (13).

I anorganski i organski oblici arsena mogu uzrokovati štetne učinke u laboratorijskih životinja, kao i u vodenim i kopnenim organizmima. Učinci su različiti i variraju od akutne letalnosti do kroničnih učinaka kao što je rak. Stupanj toksičnosti arsena tipično ovisi o obliku (npr. anorganskom ili organskom) i oksidacijskom stanju vrsta arsena. Općenito se smatra da su anorganski arsenici toksičniji nego organski, a unutar tih dvaju razreda trovalentni oblici su toksičniji od pentavalentnih vrsta, osobito pri visokim dozama. Arsen i njegovi spojevi tipično utječu na nekoliko različitih organskih sustava, uključujući kožu, respiratorne i kardiovaskularne organe, imunološki, reproduktivni, probavni i živčani sustav [8, 13]. Vodeni i kopneni organizmi pokazuju širok raspon osjetljivosti na razne vrste arsena, a na osjetljivost kritično utječu biološki i abiotički čimbenici.

Mehanizam toksičnosti i mehanizam unosa arsenovih vrsta u organizam znatno se razlikuju, što može objasniti značajne razlike u odgovoru organizma na arsenat i arsenit. Primarni mehanizam toksičnosti arsenita smatra se posljedicom njegovog vezanja na sulfhidrilne skupine proteina. Poznato je da arsenat utječe na oksidacijsku fosforilaciju kompeticijom s fosfatom. U sredinama gdje su koncentracije fosfata visoke općenito se smanjuje toksičnost arsenata na biotu. Kako je arsenat fosfatni analog, organizmi koji žive u povišenim arsenatnim sredinama moraju stjecati fosfor kao nutrijent, radi izbjegavanja ili smanjenja toksičnosti arsena (13).

Konačno, arsen i njegovi spojevi procijenjeni su kao potencijalni karcinogeni od strane Međunarodna agencije za istraživanje raka (IARC) još 1973. god. (23), a procjena je dodatno revidirana 1987. god. (24). Prema tim izvorima raspolaže se vjerodostojnim dokazima za karcinogenost kod ljudi te ograničenim dokazima za karcinogenost kod životinja. Ukupna procjena je da su arsen i njegovi spojevi kancerogeni za ljude (skupina 1). Pri tome se ova se procjena odnosi na skupinu kemikalija (tj. arsena i njegovih spojeva) kao cjeline, a ne nužno na sve pojedine spojeve unutar skupine (13).

Do sada nema podataka koji ukazuju na ksenoestrogeno djelovanje arsena ili njegovih spojeva.

## **1.2. Izvođenje SKVO za arsen**

### **1.2.1. Korištenje pristupa dodanog rizika (engl. *added risk approach*)**

Za ovo Izvješće ključni EU dokument, TGD (4) ne daje konkretne smjernice kada su u pitanju elementi kao što je arsen, a koji imaju prirodno značajne pozadinske koncentracije u okolišu, neovisno o antropogenom utjecaju. Međutim, prema najšire primjenjivanoj metodologiji koju su predložili Struijs i sur. (25), odnosno Crommentuijn i sur. (14), za rješavanje takvog problema najbolje je koristiti tzv. metodu dodanog rizika. U ovom pristupu, i predviđena koncentracija u okolišu (PEC vrijednost) i predviđena koncentracija koja nema toksičnog učinka (PNEC vrijednost) određuju se na temelju dodane koncentracije, u ovom slučaju arsena prisutnog u okolišu, što u konačnici rezultira tzv. "dodanim PEC" (PECadd), odnosno "dodanim PNEC" (PNECadd) vrijednostima. Prema tome, metoda dodanog rizika, koja se u načelu može koristiti za sve prirodne tvari, podrazumijeva da su samo antropogeni dodaci ispitivane tvari (tj. količina dodana u prirodnu pozadinsku koncentraciju) relevantni za procjenu učinka te tvari. Dakle, zanemaruje se doprinos prirodne pozadinske koncentracije na toksične učinke.

U skladu s tim postavkama, maksimalna dopuštena koncentracija (MPC) u vodenom okolišu ili sedimentu treba biti zbroj lokalne, prirodne ili pozadinske koncentracije ispitivane tvari (Cbackgrnd vrijednost) i PNECadd vrijednosti.

U tom slučaju, **PNECadd vrijednost je približno ekvivalentna SKVO vrijednosti:**

$$\text{MPC} = \text{PNECadd} + \text{Cbackgrnd} \quad (\text{PNECadd} \approx \text{EQS})$$

$$\text{PECadd} = \text{EC} - \text{Cbackgrnd} \quad (\text{EC} = \text{stvarna okolišna koncentracija na mjestu X})$$

Ovaj pristup pri tome se temelji na dvije ključne pretpostavke:

- 1) stupanj do kojeg pozadinska koncentracija metala ima utjecaj na strukturu i funkciju ekosustava nije relevantna. Bilo koji, potencijalno negativan ili pozitivan učinak pozadinske koncentracije, može se smatrati učinkom koji doprinosi prirodnoj biološkoj raznolikost ekosustava;
- 2) Budući da su vrste u ekosustavu prilagođene prevladavajućoj pozadinskoj koncentraciji, pretpostavlja se da ista količina metala dodana antropogenim djelovanjem u načelu uzrokuje isti učinak. U takvim okolnostima, međutim, svi okolišni parametri koji određuju toksičnost metala moraju biti jednaki, osim razine pozadinske koncentracije predmetnog metala (tj. nije apsolutna razina metala ta koja je odlučujuća za opseg štetnih učinaka, već samo dodana koncentracija).

Nadalje, pozadinske koncentracije i PNECadd su neovisno izvedene vrijednosti. Stvarne pozadinske koncentracije mogu se izvesti na temelju podataka o praćenju za relativno netaknute površine ili se temelje na izračunima pomoću geoloških i hidroloških podataka. I konačno, korištenje pristupa dodanog rizika podrazumijeva da u ispitivanom okolišu nema rizika od nedostatka esencijalnih metala na razini izračunatog standarda kakvoće. Prema definiciji, pozadinska koncentracija u danom ekosustavu osigurava prisutnim organizmima potrebne esencijalne metale.

### **1.3. Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenje SKVO za arsen**

#### **1.3.1. Pozadinske (okolišne) koncentracije arsena u RH**

Maksimalna dozvoljene koncentracije arsena u pitkoj prema direktivi EU je 10 µg/L (EU European Union, 1998; Tablica 5.1 ) (68). Međutim, na pojedinim područjima RH koncentracije arsena znatno su povišene. Podzemne vode Panonskog bazena (Mađarska, Rumunjska, Srbija i Hrvatska) poznate su po sadržaju prirodno povišene koncentracije arsena u podzemnim vodama što je posljedica geološkog sastava tla (64). Povišene koncentracije arsena najvjerojatnije su uzrokovane otapanjem oksidno-hidroksida željeza, mangana i aluminija uslijed reduktivnih uvjeta u vodonosniku (zbog visokog sadržaja organske tvari i/ili mikrobiološke aktivnosti) i desorpcije arsena s navedenih mineralnih faza (67).

Istraživanja koncentracije arsena u podzemnim vodama na području Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije pokazuju da uzorci podzemne vode (56 bušotina) prelaze granične vrijednosti od 10 µg/L, a koncentracije arsena kreću se od 1.3 do čak 491 µg/L (67).

Koncentracije arsena na području vodoopskrbnog područja „Vinogradi“ kraj Osijeka kreću se od 16 do 358 µg/L (uzorci uzeti iz 12 piezometara i 18 bunara s dubine u rasponu od 21-200 m, srednja vrijednost 239 µg As L-1) (65). Uočena je i povezanost dubine bunara i koncentracije ukupnog arsena, pri čemu plići bunari sadrže nižu koncentraciju arsena (65)

Za ostala područja RH podaci o koncentracijama arsena u slatkim vodama su oskudna.

### 1.3.2. PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje

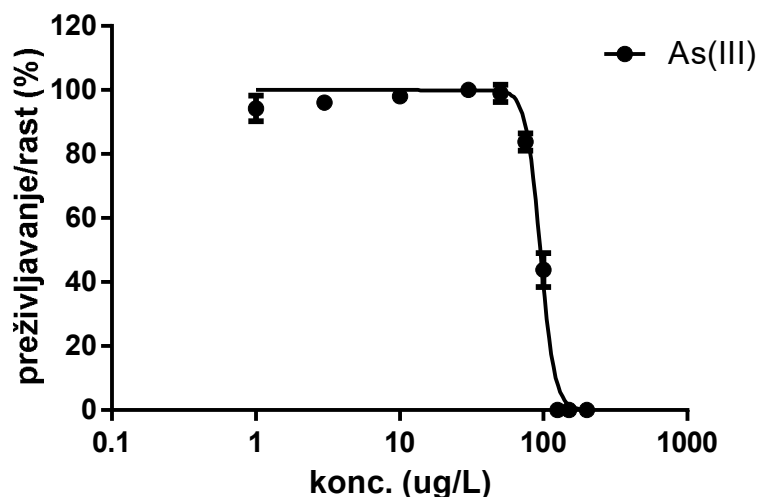
S obzirom na dostupne literaturne podatke alge se pojavljuju kao najosjetljivija taksonomska skupina u odnosu na ekotoksičnost arsena i/ili njegovih spojeva. Najnižu razinu u odnosu na akutne učinke možemo naći u studiji koju su objavili Chen i sur. (26) na algi *Scenedesmus acutus* (96 h izlaganja, EC50 79 µg/L). Čini se da su rakovi manje osjetljivi na kratkoročne učinke arsena. Najniža dostupna LC50 vrijednost je 250 µg/L za vrstu *Bosmina longirostris* (27).

Ribe su prema postojećim literaturnim podacima manje osjetljive na akutna izlaganja arsenu. Najniža vrijednost zabilježena je za juvenilni stadij vrste *Thymallus arcticus*, rezultirajući s LC50 od 4.76 mg/L (96 h izlaganje) (28). Također, čini se da su vodozemci osjetljivi na arsen, kao što ukazuje studija na žabi vrste *Rana hexadactyla* (96 h izlaganje, LC50 od 249 µg/L (29).

Postojeći podaci u velikoj mjeri poklapaju se s našim istraživanjima obavljenima u okviru ove studije. Pri tome napominjemo da smo analizirali akutni učinak arsena u tro- i pentavalentnom oksidacijskom stanju, iako je u dobro oksigeniranoj vodi i sedimentima gotovo sav arsen prisutan u termodinamički stabilnom pentavalentnom stanju (arsenat).

Naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su alge uistinu najosjetljiviji organizmi na toksičnost arsena. Kao što je prikazano na slikama 1. – 7., te tablicama 5. – 10., najniža dobivena EC50 vrijednost za jednostanične zelene alge vrste *S. subspicatus* iznosi 95.05 µg/L za As(III), odnosno 119.2 µg/L za As(V). Potom po osjetljivosti slijede embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 0.255, odnosno 1.86 mg/L, dok je najmanju osjetljivost na arsen pokazao slatkovodni planktonski račić *Daphnia magna* sa određenom LC50 za As(III) od 0.162 mg/L i LC50 od 4.36 mg/L za As (V).

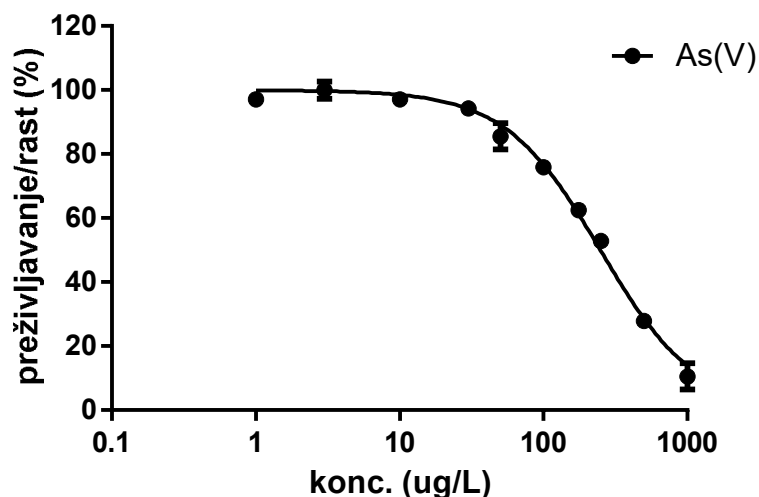




**Slika 1.** Određivanje akutne toksičnosti As(III) (testirana tvar NaAsO<sub>2</sub>) AlgalTox testom mjerenjem preživljavanja, odnosno inhibicije rasta jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5). Preživljavanje, odnosno rast algi u prisustvu različitih koncentracija NaAsO<sub>2</sub> određeno je nakon 96 h izlaganja i izraženo u % ( $\pm$  SD rezultata mjerenja uzoraka u triplikatu; SD nije prikazana u slučaju kada je < 5%) u odnosu na kontrolnu skupinu algi izlaganu bez dodatka NaAsO<sub>2</sub> (preživljavanje/rast 100%). Prikazan je tipičan rezultat pokusa izvedenog u 4 nezavisna ponavljanja.

**Tablica 5.** EC<sub>50</sub> vrijednost As(III) (koncentracija testne tvari koja uzrokuje 50% smanjenje preživljavanja/rasta algi u odnosu na kontrolnu skupinu izlaganu bez dodatka testne tvari) za algu vrste *Scenedesmus subspicatus*, s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti. Vrijednosti prikazane u tablici izvedene su na temelju rezultata 4 nezavisna pokusa.

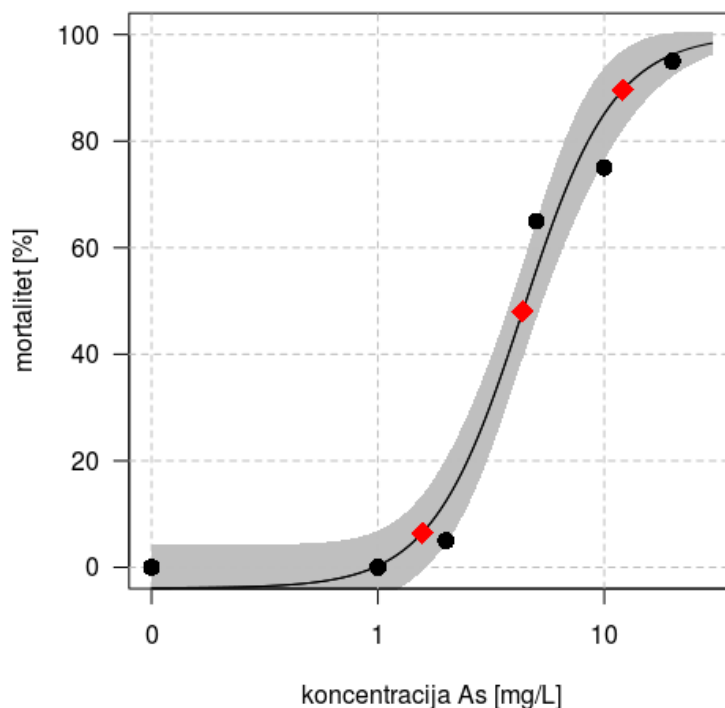
Parametar	Koncentracija [ $\mu$ g/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica) [ $\mu$ g/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica) [ $\mu$ g/L]
EC <sub>50</sub>	95.05	1.018	92.17	98.02



**Slika 2.** Određivanje akutne toksičnosti As(V) (testirana tvar  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) AlgalTox testom mjerenjem preživljavanja, odnosno inhibicije rasta jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5). Preživljavanje, odnosno rast algi u prisustvu različitih koncentracija  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  određeno je nakon 96 h izlaganja i izraženo u % ( $\pm$  SD rezultata mjerenja uzoraka u triplikatu; SD nije prikazana u slučaju kada je  $< 5\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu algi izlaganu bez dodatka  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (preživljavanje/rast 100%). Prikazan je tipičan rezultat pokusa izvedenog u 4 nezavisna ponavljanja.

**Tablica 6.**  $\text{EC}_{50}$  vrijednost As(V) (koncentracija testne tvari koja uzrokuje 50% smanjenje preživljavanja/rasta algi u odnosu na kontrolnu skupinu izlaganu bez dodatka testne tvari) za algu vrste *Scenedesmus subspicatus*, s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti. Vrijednosti prikazane u tablici kalkulirane su na temelju rezultata 4 nezavisna pokusa.

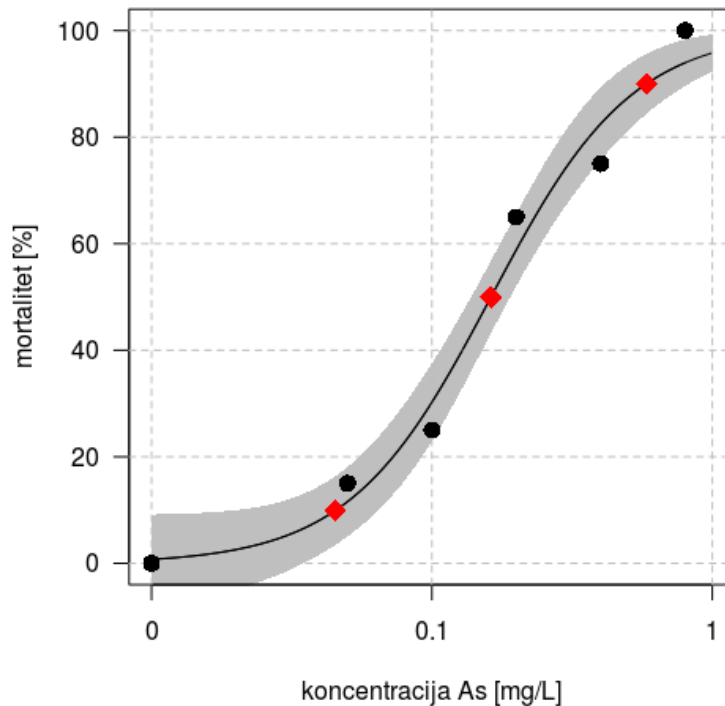
Parametar	Koncentracija [ $\mu\text{g/L}$ ]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]	95% interval pouzdanosti (gornja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]
$\text{IC}_{50}$	119.2	0.058	105.7	134.4



**Slika 3.** Mortalitet (48 h) slatkovodnog račića vrste *Daphnia magna* pri različitim koncentracijama As(V) (testirana tvar  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ). Sivo područje doza-odgovor krivulje pokazuje 95% interval pouzdanosti. Crvenim točkama označene su procijenjene  $\text{LC}_{10}(48 \text{ h})$ ,  $\text{LC}_{50}(48 \text{ h})$  i  $\text{LC}_{90}(48 \text{ h})$  vrijednosti.

**Tablica 7.** – Procijenjene letalne koncentracije As(V) za 10%, 50% i 90% populacije *Daphnia magna* -  $\text{LC}_{10}(48 \text{ h})$ ,  $\text{LC}_{50}(48 \text{ h})$  i  $\text{LC}_{90}(48 \text{ h})$  s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti procijenjenih parametara.

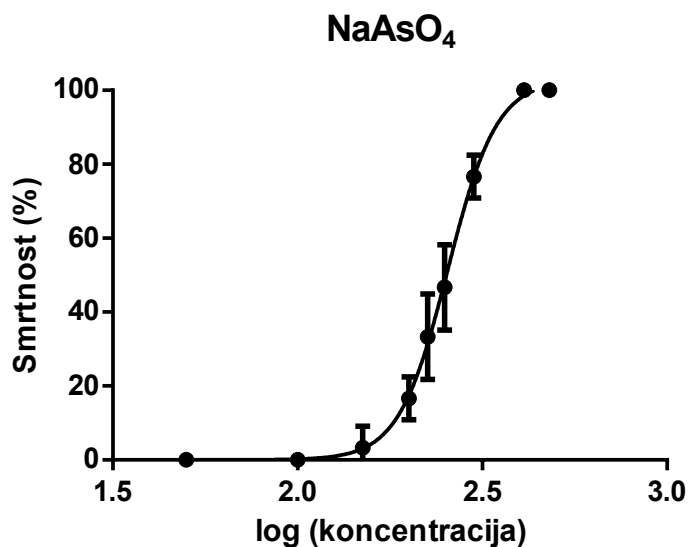
Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
$\text{LC}_{10}$	1.572	0.306	0.936	2.208
$\text{LC}_{50}$	4.359	0.384	3.561	5.157
$\text{LC}_{90}$	12.086	2.114	7.691	16.482



**Slika 4.** Mortalitet (48 h) slatkovodnog račića vrste *Daphnia magna* pri različitim koncentracijama As(III) (testirana tvar NaAsO<sub>2</sub>). Sivo područje doza-odgovor krivulje pokazuje 95% interval pouzdanosti. Crvenim točkama označene su procijenjene LC<sub>10</sub>(48 h), LC<sub>50</sub>(48 h) i LC<sub>90</sub>(48 h) vrijednosti.

**Tablica 8.** – Procijenjene letalne koncentracije As(III) za 10%, 50% i 90% populacije *Daphnia magna* - LC<sub>10</sub>(48 h), LC<sub>50</sub>(48 h) i LC<sub>90</sub>(48 h) s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti procijenjenih parametara.

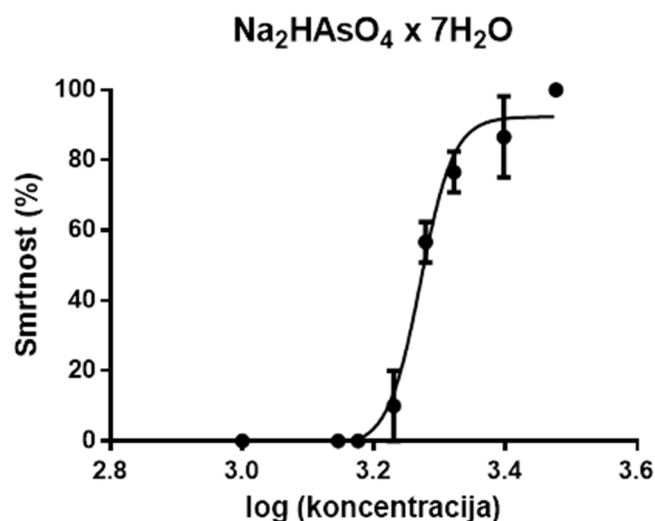
Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>10</sub>	0.045	0.010	0.024	0.067
LC <sub>50</sub>	0.162	0.016	0.128	0.196
LC <sub>90</sub>	0.582	0.099	0.377	0.787



**Slika 5.** Prikaz toksičnosti na zebricama (*Danio rerio*) u ovisnosti o koncentraciji As(III). Mortalitet označava postotak umrlih embrija 96 hpf.

**Tablica 9.** Procijenjena LC<sub>50</sub> koncentracija As(III) za embrije zebrice (*Danio rerio*), s pripadajućim vrijednostima 95% intervala pouzdanosti.

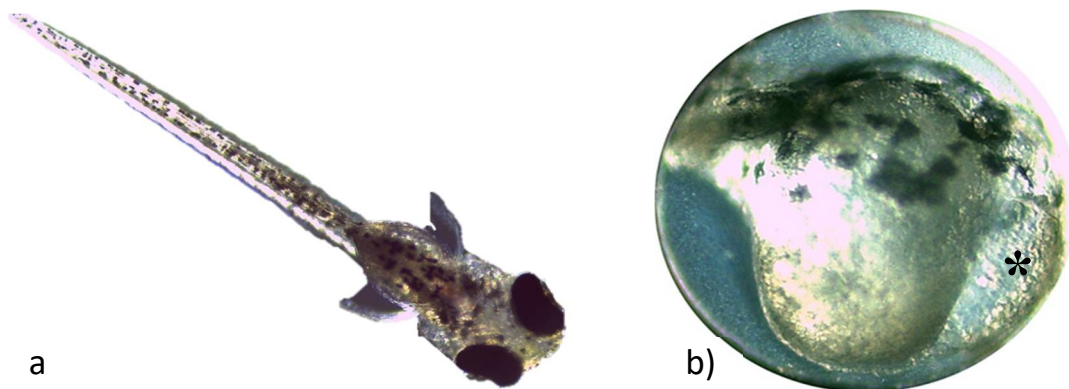
Parametar	Koncentracija [mg/L]	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>50</sub>	0.255	0.245	0.265



**Slika 6.** Prikaz toksičnosti na zebricama (*Danio rerio*) u ovisnosti o koncentraciji As(V). Mortalitet označava postotak umrlih embrija 96 hpf.

**Tablica 10.** Procijenjena LC<sub>50</sub> koncentracija As(V) za embrije zebriće (*Danio rerio*), s pripadajućim vrijednostima 95% intervala pouzdanosti.

Parametar	Koncentracija [mg/L]	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>50</sub>	1.860	1.826	1.910



**Slika 7.** Prikaz razvojnih abnormalnosti nastalih nakon 96 h izlaganja embrija zebriće (*Danio rerio*) As(V) (testirana tvar: Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O). a) kontrola prikazuje normalno razvijen embrij 96 hpf, b) nepotpuno razvijen i deformiran embrij s nastalim edemom (zvjezdica).

U skladu s ovim podacima, te uzimajući u obzir činjenicu da je za procjenu SKVO vrijednosti za vodeni okoliš termodinamički stabilan As(V) (arsenat) (eko)toksikološki puno relevantniji od As(III) vrsta, PNECadd vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost arsenu i/ili njegovim spojevima temeljimo na najnižoj EC50 vrijednosti od 119.2 µg/L ustanovljenoj za algu *S. subspicatus* za As(V) (Tablica 6.), kao što je preporučeno u smjernicama u TGD dokumentu EU (4). Osim toga, s obzirom da dostupni literaturni podaci jasno pokazuju da su alge također među najosjetljivijim organizmima kada je u pitanju dugoročna izloženost, primjena umanjenog faktora sigurnosti (engl. *assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne EC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost. U tom slučaju, određena PNEC vrijednost trebala bi spriječiti bilo koje značajnije toksične učinke na alge u slučaju akutne izloženosti i pojave kratkotrajnih visokih koncentracija arsena u vodenom okolišu.

Zaključno:

**PNECadd, slatkovodni-akutna izloženost = 119.2 µg/L / AF (10) = 12 µg/L otopljenog arsena**

### 1.3.3. PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost.

Najniže koncentracije arsena koje ne izazivaju toksični učinak (NOEC), odnosno najniže koncentracije koje izazivaju toksični učinak kod algi (LOEC) kretale su se u rasponu od 5-50 µg/L (13), i prema dostupnim podacima iz toksikoloških baza podataka alge u cjelini predstavljaju najosjetljiviju grupu organizama kada je u pitanju dugotrajna izloženost arsenu ili njegovim spojevima. Rakovi su također osjetljivi na toksično djelovanje arsena. Slatkovodni planktonski račić *Daphnia magna*, često korišten modelni organizam u testovima toksičnosti, prema raspoloživim podacima najosjetljiviji je na djelovanje arsena i zabilježene LOEC vrijednosti kreću se u rasponu od 10 – 38 µg/L. Ribe su u cjelini čini se manje osjetljive na djelovanje arsena, s najnižim zabilježenim NOEC vrijednostima za arsen(III) od 25 µg/L (30).

S obzirom na navedeno, u do sada najvjerodostojnijem Izvještaju UK Environment Agency usmjerenom određivanju SKVO vrijednosti za arsen (8), preporučeno je da se izvođenje PNECadd vrijednosti temelji na najnižoj i vjerodostojno određenoj LOEC vrijednosti od 10 µg/L zabilježenoj za slatkovodnog račića vrste *Daphnia pulex* (26). Prema tome, u skladu s uputama danim u TGD (4), NOEC vrijednost treba biti izvedena dijeljenjem LOEC vrijednosti s 2. Nadalje, s obzirom da su rezultati kronične izloženosti arsenu za najmanje tri taksonomski različite kategorije raspoloživi, odgovarajući faktor procjene (AF) koji treba primijeniti na najnižu izvedenu NOEC vrijednost je 10. Što znači da je PNECadd vrijednost za slatkovodne sustave, za kroničnu izloženost izvedena kako slijedi:

$$\text{PNECadd, slatkovodni sustavi-kronična izloženost} = \frac{10 \text{ } \mu\text{g/L}}{(2 \times \text{AF } 10)} = 0.5 \text{ } \mu\text{g/L}$$

otopljenog arsena

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost arsenu i/ili njegovim spojevima u slatkovodnim ekosistemima. Međutim, iznimno je važno napomenuti da prema postavkama obrazloženima u poglavlju 1.2.1., maksimalne dopuštene koncentracije (MOC, ili MAC vrijednosti) arsena za pojedino područje moraju biti izvedene tako da se određenoj SKVO (PNECadd) vrijednosti pridoda pozadinska koncentracija arsena ustanovljena na godišnjoj razini za predmetno područje. To je osobito važno s obzirom na koncentracije arsena u vodi za piće koje u pojedinim područjima u istočnoj Hrvatskoj višestruko premašuju propisane SKVO vrijednosti (31).

### 1.3.4. PNEC za morske vode

Slatke i slane vode se značajno razlikuju u pogledu različitih abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata. Za metale i metaloide preporuka je ne kombinirati podatke o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme, već izvoditi PNEC vrijednosti na temelju raspoloživih podataka o toksičnim učincima za slatkovodne, odnosno morske organizme.

Kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se prema tome osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama arsenu i/ili njegovim spojevima.

PNEC za kroničnu (dugotrajnu) izloženost – morske alge ponovo su se pokazale kao najosjetljiviji organizmi, a najniže zabilježene LOEC vrijednosti od 10 µg/L za As(III), odnosno 13 µg/L za As(V) publicirane su za vrstu *Skeletonema costatum* (32).

Opažene vrijednosti za kronične učinke arsena na morskim beskralješnjacima značajno su više u odnosu na vrijednosti zabilježene za morske alge. Međutim, neka istraživanja na embrijima morskog ježinca vrste *Strongylocentrosus purpuratus* rezultirala su EC10 vrijednosti od 6 µg/L (33).

Temeljem ovih i sličnih istraživanja, kao i činjenice da su na raspolaganju rezultati istraživanja kronične toksičnosti arsena na različitim (najmanje tri) taksonomskim skupinama (alge, rakovi, bodljikaši, mekušci, kolutičavci) (8), preporuka je da se PNECadd vrijednost za morske vode temelji na najnižoj zabilježenoj EC10 vrijednosti od 6 µg/L (33) i primjeni odgovarajućeg faktora procjene (AF) od 10.

Zaključno:

**PNECadd, morske vode-kronična izloženost = 6 µg/L / AF (10) = 0.6 µg/L otopljenog arsena**

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost arsenu i/ili njegovim spojevima u morskim ekosistemima, uz već prethodno opisanu korekciju pri izvođenju maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) arsena za pojedino područje u skladu s izmjerenim prirodnim, pozadinskim koncentracijama.

PNEC za akutnu (kratkotrajnu) izloženost – najniže zabilježena EC50 vrijednost za morsku algu vrste *Skeletonema costatum* bila je 9 µg/L, ali uz upitnu vjerodostojnost studije (34). Slično tome, najniža zabilježena vrijednost za beskralješnjake u ECOTOX bazi je LC50 od 3 µg/L za raka vrste *Penaeus chinensis* (96 h izlaganje), nažalost ponovo uz nemogućnost detaljnijeg uvida u istraživanje (8). Najniža iduća vrijednost, ali ovaj puta u studiji koja se može smatrati vjerodostojnom, jest EC50 od 11 µg/L (96 h) zabilježena za akutno izlaganje morskog raka vrste *Tigriopus brevicornis* (35). Ribe se ponovo prema dostupnim podacima čine manje osjetljivima na akutnu izloženost arsenu u odnosu na istraživane alge, rakove ili bodljikaše (8). Najniže publicirane LC10 vrijednosti (96 h) su približno 1 µg/L za ribu vrste *Therapon jarbua* (36).

Prema tome, s obzirom na TGD dokument EU ne daje specifične instruktivne preporuke za akutne učinke izazvane povremenim ispuštima u morske vode, preporuka je PNEC vrijednosti za akutnu izloženost izvoditi temeljem općih TGD preporuka za povremena, akutna ispuštanja (4). S obzirom na najnižu zabilježenu vjerodostojnu EC50 vrijednost od 11 µg/L za morskog raka vrste *Tigriopus brevicornis* (35), i s obzirom na činjenicu da je ta vrijednost za najosjetljiviju vrstu približno unutar raspona najnižih vrijednosti za kronično izlaganje, i u ovom slučaju odgovarajuće je primijeniti faktor procjene (AF) od 10.



Zaključno:

**PNECadd, morske vode-akutna izloženost = 11 µg/L / AF (10) = 1.1 µg/L otopljenog arsena**

Navedenu vrijednost moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju kratkotrajna (akutna) izloženost arsenu i/ili njegovim spojevima u morskim ekosistemima, uz već prethodno opisanu korekciju pri izvođenju maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) arsena za pojedino područje u skladu s izmjerenim prirodnim, pozadinskim koncentracijama.

#### **1.4. Analiza i monitoring**

Standardne metode koje su danas na raspolaganju za mjerenje koncentracija arsena i njegovih spojeva u slatkim i slanim vodama (8) brojne su i uključuju primjerice:

- ICP-MS (Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom)
- ICP-AES (Atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom)
- AAS (Atomska apsorpcijska spektroskopija)
- GFAAS (Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći)
- ASV (Anodna stripping voltametrija), i dr.

S obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije arsena u morskoj vodi 0.5 µg/L, te da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti navedenih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da su metode koje su na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.

## 2. Bakar i njegovi spojevi – sažetak

Bakar (Cu) je crvenkasti metal koji se prirodno nalazi u stijenkama, sedimentu, vodi te u niskim koncentracijama i u zraku. Može se nalaziti u četiri oksidacijska stanja: kao metal  $\text{Cu}^0$ , jednovalentni ion  $\text{Cu}^+$ , dvovalentni ion  $\text{Cu}^{2+}$  te trovalentni ion bakra  $\text{Cu}^{3+}$ . Bakar također tvori organometalne spojeve. Nalazi se u velikom broju mineralnih soli te organskih spojeva, a moguće ga je pronaći i u čistom metalnom obliku. U spojevima u kojima se pojavljuje u okolišu najčešće se nalazi u oksidacijskim stanjima +1 i +3. Bakar ima visok električni i termalni konduktivitet te je otporan na koroziju. Njegova prosječna koncentracija u zemljinoj kori iznosi 50 ppm u tlu. Osim toga, bakar se prirodno nalazi u svim organizmima kao esencijalni element. Bakar i njegovi spojevi imaju široku primjenu u industriji, te se u okolišu pojavljuje niz spojeva bakra. Reakcijom meke vode s bakrenim cijevima u vodovodnim sustavima određene količine bakra pojavljuju se u vodovodnoj vodi.

Bakar se pojavljuje u brojnim mineralima kao što su kupriti, tenorit, malakit, azurit itd. Spojevi u kojima se bakar nalazi u dvovalentnom stanju ( $\text{Cu}^{2+}$ ) znatno su topivi i uključuju kloride, nitrata i sulfata, a netopljivi spojevi bakra uključuju okside, hidrokside, karbonate i sulfide. Hidroliza i precipitacija najvažnije su reakcije u kemiji bakrovih spojeva u većini prirodnih vodenih sustava. Topivi bakreni spojevi jako se sorbiraju na suspendirane čestice. U prirodnim vodama samo mali postotak bakra prisutan je u obliku slobodnog dvovalentnog kationa ( $\text{Cu}^{2+}$ ), dok je znatno veći dio adsorbiran na suspendirane čestice ili je kompleksiran s različitim ligandima. Anorganski ligandi od najveće važnosti su hidroksidi, karbonati, a u bočatim i morskih sustavima kloridi. Vezivanje bakra na humičnu i fluvičnu kiselinu te na druge organske kiseline vrlo je jako, stoga je veliki dio otopljenog bakra zapravo prisutan u kompleksnim spojevima. U sedimentima i tlu, većina bakra nalazi se u sastavu mineralne faze ili je adsorbiran na površinu oksida ili organsku tvar. Nastajanje bakrovog sulfida značajno je za anoksične sedimente. Prisutnost kompleksnih organskih liganda može stabilizirati otopljene bakrove spojeve u slatkovodnim sustavima i spriječiti sorpciju bakra na suspendirane krute čestice. Većina netopivih i topivih bakrovih spojeva povezana je s čvrstom tvari te stoga ima malu pokretljivost u tlu i ne očekuje se njihovo isparavanje iz vode ili vlažnih površina tla.

Prilikom interpretiranja koncentracije bakra u vodi potrebno je razlikovati formu bakra, ukupni bakar ili otopljeni bakar, pri čemu je otopljena forma ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ona koja je biološki dostupna. U morskoj nekontaminiranoj vodi prosječna koncentracija bakra iznosi 0.15  $\mu\text{g/L}$ , a u slatkim vodama 1-20  $\mu\text{g/L}$ . Sediment predstavlja važan rezervoar bakra, pri čemu pozadinske koncentracije bakra u prirodnim slatkovodnim sedimentima iznose od 16 do 5000 mg/kg (suhe tvari). U morskim sedimentima koncentracije bakra kreću se od 2 do 740 mg/kg. U anoksičnim sedimentima bakar je snažno vezan u obliku sulfida te nije biološki dostupan. Nema dokaza koji podupiru postojanje procesa biotransformacije bakrovih spojeva, a koji bi značajno utjecali na sudbinu bakra u vodenom okolišu. Kao esencijalni nutrijent, bakar se snažno bioakumulira u biljnim i životinjskim tkivima, međutim, spojevi bakra se ne biomagnificiraju u višim trofičkim razinama.

Kada su u pitanju elementi kao što je bakar, a koji imaju prirodno značajne pozadinske koncentracije u okolišu, neovisno o antropogenom utjecaju, preporuka je za određivanje SKVO vrijednosti koristiti tzv. metodu dodanog rizika (engl. *added risk approach*). U ovom pristupu i predviđena koncentracija u okolišu (PEC vrijednost) i predviđena koncentracija koja nema toksičnog učinka (PNEC vrijednost) određuju se na temelju dodane koncentracije, u ovom slučaju bakra prisutnog u okolišu, što u konačnici rezultira tzv. "dodanim PEC" (PECadd), odnosno "dodanim PNEC" (PNECadd) vrijednostima. Prema tome, metoda dodanog rizika,

koja se u načelu može koristiti za sve prirodne tvari, podrazumijeva da su samo antropogeni dodaci ispitivane tvari (tj. količina dodana u prirodnu pozadinsku koncentraciju) relevantni za procjenu učinka te tvari. U skladu s tim postavkama, maksimalna dopuštena koncentracija (MPC) u vodenom okolišu treba biti zbroj lokalne, prirodne ili pozadinske koncentracije ispitivane tvari i izvedene PNECadd, odnosno SKVO vrijednosti.

Podaci o (eko)toksičnosti bakra, odnosno njegovih spojeva su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih toksikoloških *online* baza i izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih organizacija. Dostupni su podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti za različite taksonomske skupine slatkovodnih i morskih organizama. S obzirom na dostupne literaturne podatke, rakovi i alge se pojavljuju kao najosjetljivije taksonomske skupine u odnosu na ekotoksičnost bakra i/ili njegovih spojeva, a u osjetljive skupine spadaju i morski deseteronožni rakovi i školjkaši. Postojeći podaci u velikoj mjeri poklapaju se s našim istraživanjima obavljenima u okviru ove studije. Naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su alge uistinu najosjetljiviji organizmi na toksičnost bakra. Najniža dobivena EC50 vrijednost za jednostanične zelene alge vrste *Scenedesmus subspicatus* iznosi 18.46 µg/L, potom po osjetljivosti slijedi slatkovodni planktonski račić *Daphnia magna* (LC50 192 µg/L), dok su najmanju osjetljivost na akutnu izloženost bakru pokazali embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 2.07 mg/L.

U skladu s ovim podacima, PNECadd vrijednost za slatkovodne sustave i akutnu izloženost bakru i/ili njegovim spojevima temeljimo na najnižoj EC50 vrijednosti od 18.46 µg/L ustanovljenoj za algu *S. subspicatus*. Osim toga, s obzirom da dostupni literaturni podaci jasno pokazuju da su alge također među najosjetljivijim organizmima kada je u pitanju dugoročna izloženost, primjena umanjene faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne EC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost.

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti oslonili smo se na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost za slatkovodne organizme. Nadalje, kako se slatke i slane vode značajno razlikuju u pogledu različitih abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata, preporuka je da se za metale i metaloide ne kombiniraju podaci o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme. Stoga, kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti i u ovom slučaju uzeli smo raspoloživu podatke iz znanstvene literature, kao i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama bakru i/ili njegovim spojevima.

Cjeloviti pregled preporučenih SKVO vrijednosti za bakar i njegove spojeve donosimo u Tablici 11.

**Tablica 11.** Sažetak preporučenih SKVO vrijednosti za bakar i njegove spojeve.

Vodeni medij	Predložena PNEC (SKVO) vrijednost (µg/L)	
	akutna (kratkotrajna) izloženost	kronična (dugotrajna) izloženost
Slatke vode	1.9	0.5
Morske vode	2.9	2

U pogledu metodoloških zahtjeva vezanih uz analizu i monitoring bakra i njegovih spojeva, te s obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije bakra u morskoj vodi 0.29 µg/L, odnosno da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti raspoloživih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da su standardne metode koje su danas na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.

## 2.1. Rezultati

### 2.1.1. Identitet

U Tablici 12. navedeno je kemijsko ime i CAS (*Chemical Abstract Service*) broj tvari koja je testirana, odnosno za koju su predloženi odgovarajuće SKVO vrijednosti temeljem ovog Izvještaja.

**Tablica 12.** Tvar na koju se odnosi predmetni Izvještaj u ovom poglavlju je bakar (Cu), testiran u dvovalentnom ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) stanju.

Ime (kemijska oznaka)	CAS broj
Bakar (Cu)	7440-50-8
Bakrov(II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ )	7758-99-8

### 2.1.2. PNEC vrijednosti kao temelj za izvođenje SKVO vrijednosti za bakar

U skladu s postojećim znanstvenim spoznajama i metodološkim postupcima opisanim u Tehničkom priručniku (*Technical Guidance Document*; u daljnjem tekstu TGD, 4) izdanom od strane Europske agencije za kemikalije (*European Chemicals Agency*; ECHA), temelj za izvođenje SKVO vrijednosti predloženih u ovom Izvještaju su PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) vrijednosti dobivene korištenjem tri testa akutne toksičnosti koji su uključivali različite modelne organizme, odnosno taksonomske skupine, kao što je opisano u poglavlju 3.

Pri tome je važno napomenuti da se PNEC vrijednosti za bakar odnose na „dodane“ koncentracije otopljenog bakra na pozadinske koncentracije koje su normalno prisutne u prirodnim vodama. Nadalje, iako bioraspoloživost i posljedična toksičnost bakra može biti modificirana različitim promjenama u vodi ili kemijskim svojstvima sedimenta (pH, tvrdoća

vode, otopljena organska tvar i sl.), usprkos vrlo obimnim istraživanjima dostupnim u svjetskoj literaturi do sada nema jednoznačnog zaključka o statistički značajnom utjecaju tih pokazatelja na (eko)toksičnost bakra. Stoga ovi pokazatelji nisu dodatno uzimani u obzir prilikom izvođenja SKVO vrijednosti.

### 2.1.3. Klasifikacija opasnosti

U Tablici 13. dani su podaci i međunarodno prihvaćene klasifikacijske oznake rizika za bakar.

**Tablica 13.** Klasifikacija rizika za bakar.

R-oznake i označavanje	Literatura
Bakar, metal; R36-38; S2-25	73

### 2.1.4. Fizikalna i kemijska svojstva

U Tablici 14. navedena su ključna fizikalno-kemijska svojstva bakra.

**Tablica 14.** Fizikalno-kemijska svojstva bakra.

Svojstvo	Vrijednost	Literatura
Molekularna (kemijska) oznaka	Cu	73
Tlak para	1.33 kPa pri 1870°C	73
Topivost u vodi	netopiv (kao metal)	73
Relativna molekulska masa	63.564	73

### 2.1.5. Prisustvo i sudbina bakra u okolišu

Podaci o pojavnosti, abiotskoj sudbini i specijaciji bakra u okolišu iznimno su brojni i u narednim odlomcima donosimo sažeti pregled podataka važnih za ovaj Izvještaj:

Abiotska sudbina – bakar se prirodno nalazi u stijenkama, sedimentu, vodi te u niskim koncentracijama i u zraku. Pripada 11. grupi PSE. U spojevima u kojima se pojavljuje u okolišu najčešće se nalazi u oksidacijskim stanjima +1 i +3. Bakar ima visok električni i termalni konduktivitet te je otporan na koroziju. Njegova prosječna koncentracija u zemljinoj kori iznosi 50 ppm u tlu. Osim toga, bakar se prirodno nalazi u svim organizmima kao esencijalni element (74);

Specijacija u okolišu – Bakar se može nalaziti u četiri oksidacijska stanja: kao metal  $\text{Cu}^0$ , jednovalentni ion  $\text{Cu}^+$ , dvovalentni ion  $\text{Cu}^{2+}$  te trovalentni ion bakra  $\text{Cu}^{3+}$ . Bakar također tvori organometalne spojeve. Nalazi se u velikom broju mineralnih soli te organskih spojeva, a moguće ga je pronaći i u čistom metalnom obliku. Metal je crvenkasto-smeđe boje, kovan, te je dobar termički i električni vodič. Metalni oblik je vrlo stabilan na suhom zraku i pri nižim temperaturama, no podložan je reakciji s vodom u zraku pri čemu tvori hidroksikarbonate ili hidroksulfate, pri čemu na površini metala nastaje zelenkasto-zeleni amorfni film koji štiti metal od daljnje korozije. Kemijska svojstva elementa, posebice u biološkim sustavima pod jakim su utjecajem oksidacijskog stanja bakra. Laka promjena oksidacijskih stanja daje bakru

redoks svojstva koja određuju njegovu ulogu u biološkim sustavima, kao esencijalnog elementa ili kao toksikanta. Najvažnije oksidacijsko stanje bakra u prirodnim vodenim sustavima je oblik dvovalentnog kationa ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Jednovalentni ion ( $\text{Cu}^+$ ) vrlo brzo oksidira u prisutnosti gotovo svakog reducensa, osim ako nije stabiliziran formiranjem kompleksa. Dvovalentni ion bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) uglavnom se veže pomoću kisika na anorganske ligande kao što su  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i na organske ligande pomoću fenolnih i karboksilnih skupina. Gotovo sav bakar u prirodnim sustavima kompleksiran je s organskim molekulama. Mnogi spojevi u kojima je bakar prisutan kao dvovalentni ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) lako su topivi u vodi i imaju karakterističnu plavkasto-zelenkastu boju. Trovalentni ion bakra ( $\text{Cu}^{3+}$ ) nalazi se samo u nekoliko spojeva i vrlo je jak oksidans (74).

Fotosjetljivost – lako su pojedini spojevi bakra fotoosjetljivi (npr. bakrov jodid), ne postoje dokazi koji upućuju da je fotoliza važan mehanizam koji određuje sudbinu bakrovih spojeva u slatkovodnim sustavima. Istraživanja vezana uz dostupnost  $\text{Cu}^+$  u morskoj vodi pokazala su kako se  $\text{Cu}^{2+}$  reducira u  $\text{Cu}^+$  nizom fotokemijskih reakcija pri čemu nastaje kompleksa s ionima klora ( $\text{Cl}^-$ ) (72).

Distribucija u sustavima voda/sediment – u prirodnim vodama samo mali postotak bakra prisutan je u obliku slobodnog dvovalentnog kationa ( $\text{Cu}^{2+}$ ), dok je znatno veći dio adsorbiran na suspendirane čestice ili je kompleksiran s različitim ligandima. Anorganski ligandi od najveće važnosti su hidroksidi, karbonati, a u bočatim i morskih sustavima kloridi. Vezivanje bakra na humičnu i fluvičnu kiselinu te na druge organske kiseline vrlo je jako, stoga je veliki dio otopljenog bakra zapravo prisutan u kompleksnim spojevima. U sedimentima i tlu, većina bakra nalazi se u sastavu mineralne faze ili je adsorbiran na površinu oksida ili na organsku tvar. Nastajanje bakrovog sulfida značajno je za anoksične sedimente (74).

Nekoliko različitih procesa utječe na sudbinu bakra u vodenim sustavima: kompleksiranje s organskim i anorganskim ligandima; sorpcija na okside metala, gline te partikularnu organsku tvar; te bioakumulacija i izmjena između sedimenta i vodenog stupca. Većina bakra prisutnog u vodi nalazi se u obliku čestica te se s vremenom sliježe, precipitira ili adsorbira na organsku tvar, okside mangana i glinu u sedimentu ili vodenom stupcu. Stanje ravnoteže postiže se obično unutar 24 sata. Jednovalentni ion bakra ( $\text{Cu}^+$ ) vrlo je nestabilan u vodenim sustavima te reakcijom disproporcioniranja prelazi u dvovalentni ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ili oblik metala  $\text{Cu}^0$ , osim ako nije prisutan stabilizirajući ligand. Jedini spojevi u kojima je bakar prisutan kao jednovalentni kation ( $\text{Cu}^+$ ) i koji su stabilni u vodenim sustavima su netopivi spojevi kao sulfidi, cijanid i fluoridi (74).

Stupanj degradacije u tlu – u terestričkim sustavima niz čimbenika utječe na sudbinu bakra u tlu: vrta tla, pH, tip i distribucija organske tvari, redoks potencijal, prisutnost oksida, kapacitet izmjene kationa (CEC – *cation exchange capacity*), brzina razgradnje organske tvari te omjer glina : prah : pijesak. Vrijeme zadržavanja bakra u tlu primarno je funkcija klimatskih čimbenika i vegetacije podneblja. Većina bakra koja dopijeva na tlo iz atmosfere ili zbog aplikacije u poljoprivredi snažno se adsorbira u 5-10 cm gornjih centimetara tla. Posebice se veže za organsku tvar u tlu, te za karbonatne minerale i oksonijev ion i okside mangana. Vezanje bakra za tlo puno je snažnije u odnosu na ostale metale te na veze u znatno manjoj mjeri utječu promjene u pH tla. Najveće ispiranje bakra je u pješčanim tlima, u usporedbi s glinastim i tresetastim tlima (74).

Prirodne koncentracije bakra u okolišu – koncentracija bakra u zraku primarno ovisi o udaljenosti od potencijalnih izvora onečišćenja – tvornice, elektrane, spalionice i sl. Bakar je

široko rasprostranjen u vodenom okolišu u kojem se prirodno pojavljuje. Prilikom interpretiranja koncentracije bakra u vodi potrebno je razlikovati formu bakra, ukupni bakar ili otopljeni bakar, pri čemu je otopljena forma ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ona koja je biološki dostupna. Prosječne pozadinske koncentracije bakra u zraku u ruralnim područjima kreću se od 5 do 50  $\text{ng}/\text{m}^3$ . U morskoj nekontaminiranoj vodi prosječna koncentracija bakra iznosi 0.15  $\mu\text{g}/\text{L}$  a u slatkim vodama 1-20  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Sediment predstavlja važan rezervoar bakra, pri čemu pozadinske koncentracije bakra u prirodnim slatkovodnim sedimentima iznose od 16 do 5000  $\text{mg}/\text{kg}$  (suhe tvari). U morskim sedimentima koncentracije bakra kreću se od 2 do 740  $\text{mg}/\text{kg}$ . U anoksičnim sedimentima bakar je snažno vezan u obliku sulfida te nije biološki dostupan. Medijan koncentracije bakra u nekontaminiranim tlima iznosi 30  $\text{mg}/\text{kg}$  (raspon od 2 do 250  $\text{mg}/\text{kg}$ ). Bakar bioakumuliraju biljke, beskralješnjaci i ribe. (74)

Biološka transformacija – Bakar je jedan od esencijalnih elemenata nužan za normalno funkcioniranje svih skupina organizama, s posebnim naglaskom na njegovu važnost u izgradnji metaloproteina. Kao dio ciklusa bakra, odumiranjem organizama u njima akumuliran bakar vraća se u okoliš. Laboratorijska ispitivanja provedena na gljivi *Rhodotorula mucilaginosa* LM9 (75) pokazuju kako taj organizam ima važnu ulogu u biološkoj transformaciji bakra. Ona ima sposobnost mobilizacije i imobilizacije bakra iz sedimentarnih stijena te pokazuje otpornost i visoku stopu akumulacije ovog elementa.

Bioakumulacija i biokoncentracija – u literaturi postoji znatna količina podataka o akumulaciji bakra koje se potencijalno mogu iskoristiti za izračun biokoncentracijskih faktora (BCF) i bioakumulacijskih faktora (BAF) te procjenu pripadajućeg rizika u vodenom okolišu. No, zbog homeostatske regulacije koncentracije bakra (i drugih metala) u živim organizmima bioakumulacijski faktor nije nezavisan od koncentracije kojoj je organizam izložen (76). Povećan ili smanjen unos bakra dovodi do obrnuto proporcionalne promijene u BAF i BCF vrijednostima. Posebice za bakar, ovaj obrnuto proporcionalni odnos koncentracije bakra kojoj je organizam izložen dokazan je za BAF biota-sediment. Ovaj učinak objašnjen je homeostatskom regulacijom koncentracije bakra u tkivima; pri niskim koncentracijama metala organizmi aktivno akumuliraju metale za potrebe metabolizma, dok kod viših koncentracija metala u okolišu organizmi izbacuju višak metala ili ograničavaju njihov unos (77). Za terestričke organizme također vrijedi homeostatska regulacija koncentracije bakra (i drugih metala) u organizmu, pri čemu također postoji obrnuto proporcionalan odnos između koncentracije bakra kojoj je organizam bio izložen i BCF (77).

#### 2.1.6. Dostupni podaci o (eko)toksičnosti bakra

Podaci o (eko)toksičnosti bakra su brojni i dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih baza (osobito EPA ECOTOX baza podataka, <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> te TOXNET baza, <https://toxnet.nlm.nih.gov/>). Najvažniji i najkompletniji podaci mogu se naći u javno dostupnim publikacijama, a pri tome su za svrhu ovog Izvješća najvažniji slijedeći izvori:

- NAS, Copper (Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants; 1974) (82)
- USEPA, Ambient Water Quality Criteria Doc: Copper; 1980 (83)
- USEPA, Health Issue Assessment: Copper; 1987 (84)
- USEPA; Drinking Water Criteria Document for Copper (Final Draft; 1985) (85)

- USEPA, Ambient Water Quality Criteria Doc: Copper (1984) EPA 440/5-84-031 (86).
- ATSDR; Toxicological Profile for Copper (87)
- SCHER, Voluntary Risk Assessment Report on Copper and its compounds (88)

Navedeni izvori upotpunjeni su pretraživanjem najnovije znanstvene literature (putem Web of Science i Scopus baza podataka) i preglednih znanstvenih publikacija vezanih uz ekotoksičnost bakra i njegovih spojeva (78, 79, 80). Novija istraživanja nisu rezultirala značajnijim novim saznanjima o (eko)toksičnim učincima bakra i njegovih spojeva. Za svrhu ovog Izvješća ukratko su navedene osnovne informacije o toksičnosti bakra, odnosno njegovih spojeva, za slatkovodne i morske organizme.

Toksičnost za slatkovodne organizme – u literaturi su dostupni podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti bakra i njegovih spojeva za različite taksonomske skupine biljnih organizama, beskralježnjaka i kralježnjaka. Prema provedenim istraživanjima akutne toksičnosti, među slatkovodnim beskralježnjacima ističu se puževi, maločetinaši, vodenbuhe (*Daphnia sp.*), kolnjaci, deseteronožni rakovi, ribe i punoglavci, od kojih su se *Daphnia sp.* pokazale najosjetljivijima na prisutnost bakrovih spojeva. Alge i planktonski rakovi također su vrlo osjetljivi na kronično izlaganje bakru i njegovim spojevima, a u osjetljive skupine spadaju i deseteronožni rakovi i školjkaši (74).

Toksičnost za morske organizme – podatci iz dosad provedenih istraživanja pružaju uvid u toksične učinke bakra i njegovih spojeva na morske biljne organizme, beskralježnjake i kralježnjake pri kroničnom i akutnom izlaganju. Među morskim organizmima, slično kao i među slatkovodnim, prema osjetljivosti na akutnu i kroničnu izloženost ističu se alge, rakovi, puževi te ribe na koje ti spojevi djeluju smanjujući uspješnost oplodnje te uzrokujući deformacije embrija i ličinačkih stadija (74).

#### 2.1.7. Mehanizam toksičnosti bakra i njegovih spojeva

Potrebe za bakrom pojedinih organa ili organskih sustava unutar tijela regulirane su pomoću homeostatskih kontrolnih mehanizama. Do toksičnih učinaka dolazi uglavnom uslijed poremećaja sustava održavanja homeostaze u pojedinim kompartmentima ili kada su osnovni stanični mehanizmi popravka oštećeni. Potencijalna toksičnost bakra u biološkim sustavima uzrokovana je specifičnom elektronskom konfiguracijom bakra, posebice vanjskim elektronskim ljuskama. Jednovalentni kation bakra ( $\text{Cu}^+$ ) lako se polarizira te se veže uglavnom na ligande koji sadrže dušik ili sumpor, pri čemu dolazi do dijeljenja elektronskih orbitala. Dvovalentni kation bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) može formirati koordinacijske komplekse s ligandima koji sadrže kisik te djelomično može stvarati kovalentnu vezu s molekulama u čijem centru se nalaze dušik ili sumpor. Bakar je vrlo reaktivan, te se može čvrsto vezati za mnoge strukture bogate elektronima. Afinitet bakrovih iona prema određenim ligandima pod utjecajem je polarnosti liganda na koji se bakar veže (74).

Do pojave toksičnih učinaka bakra dolazi kada višak bakra u organizmu izazove neku od slijedećih reakcija:

- Strukturna oštećenja osnovnih mjesta u proteinu na koji se vežu metali, ili zamijene metala u proteinu zbog čega dolazi do promjena u depolarizaciji i oštećenju receptora transportnih molekula;



- Funkcionalna oštećenja do kojih dolazi uslijed vezanja bakra na ključna mjesta nekih važnih molekula kao što su DNA ili enzimi (posebice onih koji sadrže sulfhidrile, karboksilate ili imidazole), pri čemu dolazi do izravnog oštećenja proteina, te oksidativnih promjena DNA što posljedično dovodi do funkcionalnih promjena na samim proteinima ili DNA;
- Oštećenja stanice uslijed proizvodnje slobodnih radikala kisika Fentonovom reakcijom:  

$$\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \implies \text{Cu}^{2+} + \text{OH}^* + \text{OH}^-$$
- Prekomjerna produkcija radikala inicira kaskadu oksidacijsko-redukcijskih reakcija (oksidativni stres) što dovodi do gubitka integriteta stanice. Posljedično, dolazi do porasta koncentracije kalcija u citosolu, iscrpljivanja/trošenja ATP, oksidacije tiola, lipidne peroksidacije, oštećenja DNA te oštećenja organela kao što su mitohondriji i lizosomi.

## 2.2. Izvođenje SKVO za bakar

### 2.2.1. Korištenje pristupa dodanog rizika (engl. *added risk approach*)

Za ovo Izvješće ključni EU dokument, TGD (4) ne daje konkretne smjernice kada su u pitanju elementi kao što je bakar, a koji imaju prirodno značajne pozadinske koncentracije u okolišu, neovisno o antropogenom utjecaju. Međutim, prema najšire primjenjivanoj metodologiji koju su predložili Struijs i sur. (25), odnosno Crommentuijn i sur. (14), za rješavanje takvog problema najbolje je koristiti tzv. metodu dodanog rizika. U ovom pristupu, i predviđena koncentracija u okolišu (PEC vrijednost) i predviđena koncentracija koja nema toksičnog učinka (PNEC vrijednost) određuju se na temelju dodane koncentracije, u ovom slučaju bakra prisutnog u okolišu, što u konačnici rezultira tzv. "dodanim PEC" (PECadd), odnosno "dodanim PNEC" (PNECadd) vrijednostima. Prema tome, metoda dodanog rizika, koja se u načelu može koristiti za sve prirodne tvari, podrazumijeva da su samo antropogeni dodaci ispitivane tvari (tj. količina dodana na prirodnu, pozadinsku koncentraciju) relevantni za procjenu učinka te tvari. Dakle, zanemaruje se doprinos prirodne pozadinske koncentracije na toksične učinke.

U skladu s tim postavkama, maksimalna dopuštena koncentracija (MPC) u vodenom okolišu ili sedimentu je zbroj lokalne, prirodne ili pozadinske koncentracije ispitivane tvari prirodne pozadine (Cbackgrnd vrijednosot) i PNECadd vrijednosti.

U tom slučaju, **PNECadd vrijednost je približno ekvivalentna SKVO vrijednosti:**

$$\text{MPC} = \text{PNECadd} + \text{Cbackgrnd} \quad (\text{PNECadd} \approx \text{EQS})$$

$$\text{PECadd} = \text{EC} - \text{Cbackgrnd} \quad (\text{EC} = \text{stvarna okolišna koncentracija na mjestu X})$$

Ovaj pristup pri tome se temelji na dvije ključne pretpostavke:

- 1) stupanj do kojeg pozadinska koncentracija metala ima utjecaj na strukturu i funkciju ekosustava nije relevantna. Bilo koji, potencijalno negativan ili pozitivan učinak

pozadinske koncentracije, može se smatrati učinkom koji doprinosi prirodnoj biološkoj raznolikost ekosustava;

- 2) Budući da su vrste u ekosustavu prilagođene prevladavajućoj pozadinskoj koncentraciji, pretpostavlja se da ista količina metala dodana antropogenim djelovanjem u načelu uzrokuje isti učinak. U takvim okolnostima, međutim, svi okolišni parametri koji određuju toksičnost metala moraju biti jednaki, osim razine pozadinske koncentracije predmetnog metala (tj. nije apsolutna razina metala ta koja je odlučujuća za opseg štetnih učinaka, već samo dodana koncentracija).

Nadalje, pozadinske koncentracije i PNECadd su neovisno izvedene vrijednosti. Stvarne pozadinske koncentracije mogu se izvesti na temelju podataka o praćenju za relativno netaknute površine ili se temelje na izračunima pomoću geoloških i hidroloških podataka. I konačno, korištenje pristupa dodanog rizika podrazumijeva da u ispitivanom okolišu nema rizika od nedostatka esencijalnih metala na razini izvedenog standarda kakvoće. Prema definiciji, pozadinska koncentracija u danom ekosustavu osigurava prisutnim organizmima potrebne esencijalne metale.

### **2.3. Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenja SKVO za bakar**

#### **2.3.1. Pozadinske (okolišne) koncentracije bakra u RH**

Mjerenja koncentracije bakra na području rijeke Save (Otok Samoborski, Zagreb, Oborovo, Lukavec Posavski, Jasenovac) pokazuju raspon koncentracija od 0.05 do 0.88 ug/L (70). Rezultati kemijskog monitoringa provedeni na tri lokacije na području RH: Veličanka (Istočna Slavonija), Bukovska Dobra (Gorski kotar) i Sutla-Lupinjak (sjeverni dio RH), pokazuju kako koncentracija bakra u rijekama često nije stalna tijekom godine. Prema Uredbi o klasifikaciji voda spomenute vodene mase prema koncentraciji bakra pripadaju I. vrsti voda, što znači da je koncentracija bakra manja od 2 ug/L (90).

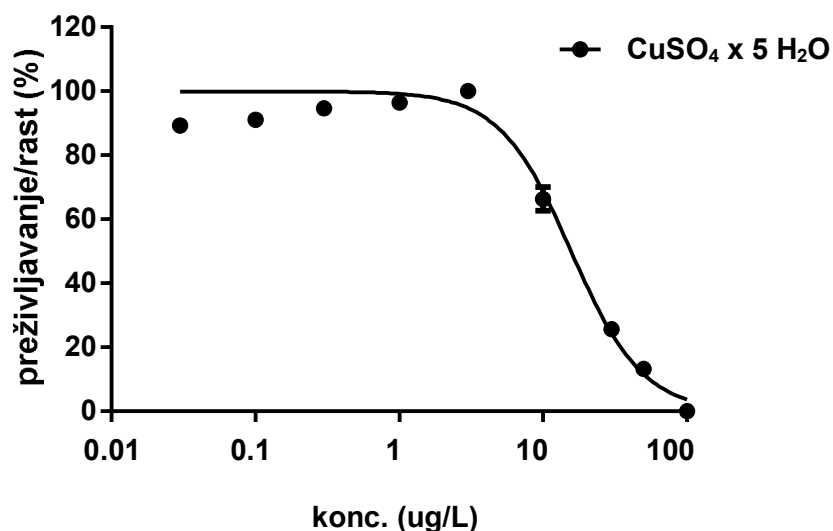
Mjerenja koncentracije bakra u stupcu morske vode dostupna su za područje u neposrednoj okolini grada Šibenika, pri čemu mjerenja pokazuju da je prosječna koncentracija bakra 0.46 µg/L (89). Mjerenja na području ušća Krke (poluotok Mandalina) pokazuju koncentracije bakra od 1 do 2.5 ug/L na dubini od 3.5 m te 0.4 do 0.95 ug/L na dubinama od 20 cm (69).

#### **2.3.2. PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje**

Iz pregleda raspoložive literature vidljivo je da su alge najosjetljivija taksonomska skupina na toksičnost bakra, sa zabilježenim NOEC vrijednostima za algu vrste *Pseudokirchneriella subcapitata* od 17.9 µg/L, odnosno 15.7 µg/L za vrstu *Raphidocelis subcapitata* te 22 µg/L za vrstu *Chlamydomonas reinhardtii* (91).

Naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su alge uistinu najosjetljiviji organizmi na toksičnost bakra. Kao što je prikazano na slikama 8. – 11., te tablicama 15. – 17., najniža dobivena EC50 vrijednost za jednostanične zelene alge vrste *S. subspicatus* iznosi 18.46 µg/L, potom po osjetljivosti slijedi slatkovodni planktonski račić *Daphnia magna* (LC50 192 µg/L), dok su najmanju osjetljivost na

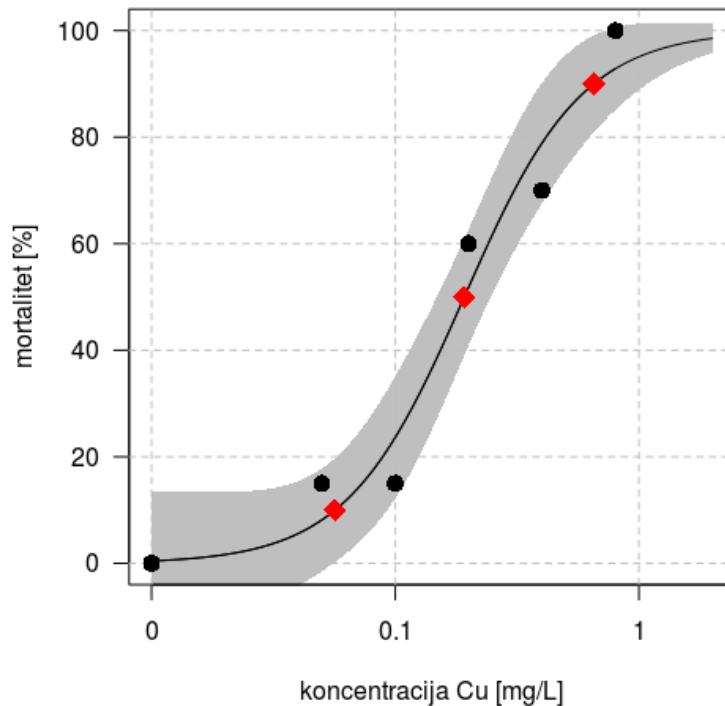
akutnu izloženost bakru pokazali embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 2.07 mg/L.



**Slika 8.** Određivanje akutne toksičnosti bakra (testirana tvar  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) AlgalTox testom mjerenjem preživljavanja, odnosno inhibicije rasta jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5). Preživljavanje, odnosno rast algi u prisustvu različitih koncentracija  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  određeno je nakon 96 h izlaganja i izraženo u % ( $\pm$  SD rezultata mjerenja uzoraka u triplicatu; SD nije prikazana u slučaju kada je < 5%) u odnosu na kontrolnu skupinu algi izlaganu bez dodatka bakra (preživljavanje/rast 100%). Prikazan je tipičan rezultat pokusa izvedenog u 4 nezavisna ponavljanja.

**Tablica 15.**  $\text{EC}_{50}$  vrijednost  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (koncentracija testne tvari koja uzrokuje 50% smanjenje preživljavanja/rasta algi u odnosu na kontrolnu skupinu izlaganu bez dodatka testne tvari) za algu vrste *Scenedesmus subspicatus*, s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti. Vrijednosti prikazane u tablici kalkulirane su na temelju rezultata 4 nezavisna pokusa.

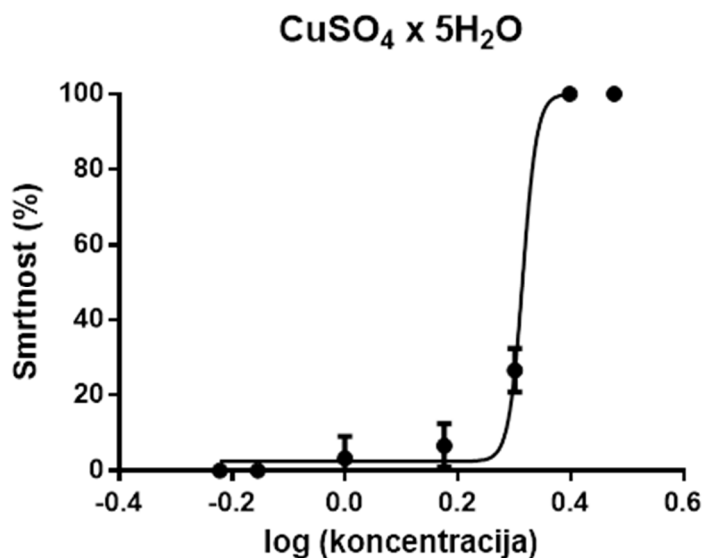
Parametar	Koncentracija [ $\mu\text{g/L}$ ]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]	95% interval pouzdanosti (gornja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]
$\text{EC}_{50}$	18.46	1.92	13.24	21.6



**Slika 9.** Mortalitet (48 h) *Daphnia magna* pri različitim koncentracijama bakra (testirana tvar:  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ). Sivo područje oko doza-odgovor krivulje pokazuje 95% interval pouzdanosti. Crvenim točkama označene su procijenjene  $\text{LC}_{10}(48 \text{ h})$ ,  $\text{LC}_{50}(48 \text{ h})$  i  $\text{LC}_{90}(48 \text{ h})$  vrijednosti.

**Tablica 16.** – Procijenjene letalne koncentracije bakra (Cu) za 10%, 50% i 90% populacije *Daphnia magna* -  $\text{LC}_{10}(48 \text{ h})$ ,  $\text{LC}_{50}(48 \text{ h})$  i  $\text{LC}_{90}(48 \text{ h})$ , s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti procijenjenih parametara.

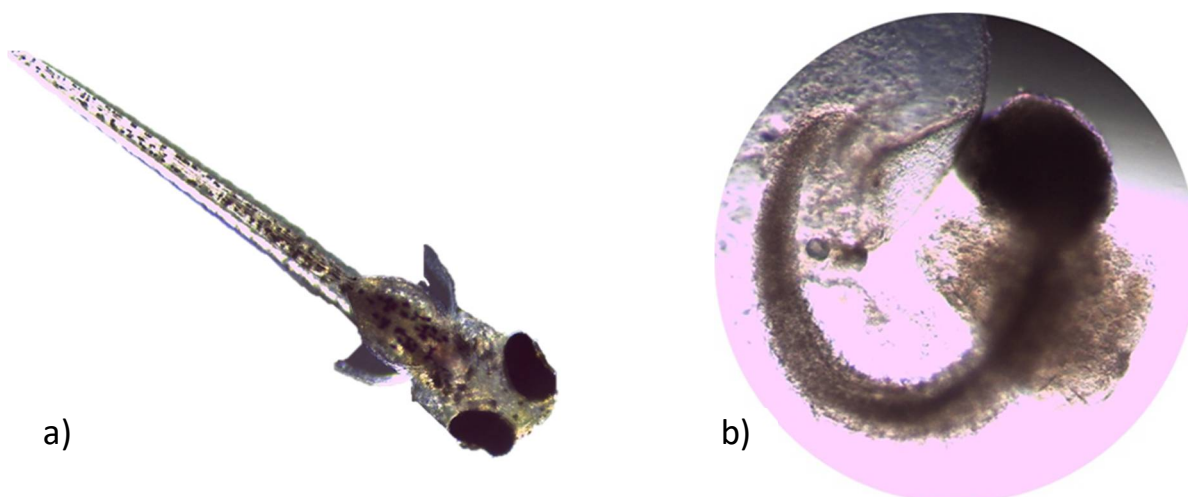
Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
$\text{LC}_{10}$	0.056	0.020	0.015	0.098
$\text{LC}_{50}$	0.192	0.029	0.131	0.253
$\text{LC}_{90}$	0.653	0.171	0.298	1.008



**Slika 10.** - Prikaz toksičnosti na zebriticama (*Danio rerio*) u ovisnosti o koncentraciji bakra (Cu) (testirana tvar: CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O). Mortalitet označava postotak umrlih embrija 96 hpf.

**Tablica 17.** Procijenjena LC<sub>50</sub> koncentracija bakra (Cu) za zebriće (*Danio rerio*) s pripadajućim vrijednostima 95% intervala pouzdanosti.

Parametar	Koncentracija [mg/L]	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>50</sub>	2.07	1.63	2.62



**Slika 11.** Prikaz razvojnih abnormalnosti nastalih nakon 96 h izlaganja embrija zebriće (*Danio rerio*) bakru (testirana tvar: CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O). a) kontrola prikazuje normalno razvijen embrij 96 hpf, b) potpuna nekroza embrija.

U skladu s ovim podacima, PNECadd vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost bakru i/ili njegovim spojevima temeljimo na najnižoj EC50 vrijednosti od 18.46 µg/L ustanovljenoj za algu *S. subspicatus* (Tablica 15.), kao što je preporučeno u smjernicama u TGD dokumentu EU (4). Osim toga, s obzirom da dostupni literaturni podaci jasno pokazuju da su alge također među najosjetljivijim organizmima kada je u pitanju dugoročna izloženost, te uzimajući u obzir raspoloživost podataka o akutnoj i kroničnoj izloženosti za različite taksonomske kategorije slatkovodnih organizama, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne EC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost. U tom slučaju, određena PNEC vrijednost trebala bi spriječiti bilo koje značajnije toksične učinke na alge u slučaju akutne izloženosti i pojave kratkotrajnih visokih koncentracija bakra u vodenom okolišu.

Zaključno:

**PNECadd, slatkovodni-akutna izloženost = 18.5 µg/L / AF (10) = 1.9 µg/L otopljenog bakra**

### 2.3.3. PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti, te se stoga kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost.

Iz dostupne literature izdvojene su NOEC vrijednosti pri kroničnoj izloženosti bakru u slatkovodnim ekosustavima za slijedeće životinjske vrste: puž *Juga plicifera* (NOEC 6 µg/L), školjkaš *Dreissena polymorpha* (NOEC 16 µg/L), vodenbuha *Ceriodaphnia dubia* (NOEC 34.6 µg/L) i *Daphnia magna* (NOEC 20 µg/L), rak *Hyaella azteca* (NOEC 32 µg/L) te ribe *Catostomus commersoni* (NOEC 12.9 µg/L) i *Esox lucius* (NOEC 34.9 µg/L). Alge pokazuju različit raspon kronične NOEC vrijednosti, sa vrijednostima za *Chlamydomonas reinhardii* od 5 µg/L, *Scenedesmus subspicata* od 5.6 µg/L te *Chlorella vulgaris* od 31 µg/L (71)

Prema navedenim podacima alga *Chlamydomonas reinhardii* ima najnižu zabilježenu NOEC vrijednost za kronično izlaganje s vrijednosti od 5 µg/L, stoga je i ta vrijednost korištena za izvođenje PNECadd vrijednosti.

Nadalje, s obzirom da su rezultati kronične izloženosti bakru za najmanje tri taksonomski različite kategorije raspoloživi, odgovarajući faktor procjene (AF) koji treba primijeniti na najnižu izvedenu NOEC vrijednost je 10. Što znači da je PNECadd vrijednost za slatkovodne sustave, za kroničnu izloženost izvedena kako slijedi:

**PNECadd, slatkovodni sustavi-kronična izloženost = 5 µg/L / AF (10) = 0.5 µg/L otopljenog bakra**

Navedenu vrijednost prema našem moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost bakru i/ili njegovim spojevima u slatkovodnim ekosistemima. Međutim, iznimno je važno napomenuti da prema postavkama

obrazloženima u poglavlju 1.2.1., maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) bakra za pojedino područje moraju biti izvedene tako da se određenoj SKVO vrijednosti pridoda pozadinska koncentracija bakra ustanovljena na godišnjoj razini za predmetno područje.

#### 2.3.4. PNEC za morske vode

Slatke i slane vode se značajno razlikuju u pogledu abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata. Za metale i metaloide preporuka je ne kombinirati podatke o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme, već izvoditi PNEC vrijednosti na temelju raspoloživih podataka o toksičnim učincima za slatkovodne, odnosno morske organizme.

Kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se prema tome osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama bakru i/ili njegovim spojevima.

PNEC za kroničnu (dugotrajnu) izloženost – morske alge najosjetljivije su na kroničnu izloženost bakru. Najniža normalizirana NOEC/L(E)C10 vrijednost od 2.03 µg/L zabilježena je za vrstu *Phaeodactylum tricornutum* (83)

Normalizirane NOEC/L(E)C10 vrijednosti za ribe više su u odnosu na vrijednosti zabilježene u odnosu na kolutičavce, plaštenjake, žarnjake, rakove, bodljikaše i mekušce te iznose 55.35 µg/L i 57.12 µg/L (*Atherinopsis affinis*, *Cyprinodon variegatus*). Najviša NOEC/L(E)C10 od 141.40 µg/L objavljena je za raka vrste *Penaeus monodon*, iako su ostale vrijednosti koje se mogu naći u literaturi znatno niže i u rasponu su od 6.30 do 29.40 µg/L (83).

Temeljem ovih i sličnih istraživanja, kao i činjenice da su na raspolaganju rezultati istraživanja kronične toksičnosti bakra na različitim (najmanje tri) taksonomskim skupinama (alge, rakovi, bodljikaši, mekušci, kolutičavci), preporuka je da se PNECadd vrijednost za morske vode temelji na najnižoj zabilježenoj NOEC vrijednosti od 2.03 µg/L i primjeni odgovarajućeg faktora procjene (AF) od 1.

Zaključno:

**PNECadd, morske vode-kronična izloženost = 2.03 µg/L / AF (1) = 2 µg/L otopljenog bakra**

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost bakru i/ili njegovim spojevima u morskim ekosistemima, uz već prethodno opisanu korekciju pri izvođenju maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) bakra za pojedino područje u skladu s izmjerenim prirodnim, pozadinskim koncentracijama.

### PNEC za akutnu (kratkotrajnu) izloženost

Provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, pa je kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti korištena raspoloživa literatura i izvještaji drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama bakru i/ili njegovim spojevima.

Pregledom dostupne literature ustanovljeno je da su alge najosjetljiviji organizmi sa NOEC vrijednostima od 2.9 µg/L za vrstu *Phaeodactylum tricornutum*, te 7.5 µg/L za vrstu *Skeletonema costatum* (92). Ježinci i žarnjaci su prema literaturnim podacima sljedeća osjetljiva skupina sa NOEC vrijednostima od 16.5 µg/L (žarnjak *Acropora tenuis*) i 16.5 µg/L (ježinac *Paracentrotus lividus*). Prema dostupnim podacima kolnjaci su manje osjetljivi na toksičnost bakra sa NOEC vrijednosti od 50 µg/L (*Brachionus plicatilis*), a najmanje su osjetljive ribe sa NOEC vrijednosti od 109 µg/L *Atherinops affinis* (92).

Temeljem ovih i sličnih istraživanja, kao i činjenice da su na raspolaganju rezultati istraživanja kronične toksičnosti bakra na tri trofičke razine (alge, kolnjaci i ribe), preporuka je da se PNECadd vrijednost za morske vode temelji na najnižoj zabilježenoj NOEC vrijednosti od 2.9 µg/L i primjeni odgovarajućeg faktora procjene (AF) od 1.

Zaključno:

**PNECadd, morske vode-akutna izloženost = 2.9 µg/L / AF (1) = 2.9 µg/L otopljenog bakra**

Navedenu vrijednost moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju kratkotrajna (akutna) izloženost bakru i/ili njegovim spojevima u morskim ekosistemima, uz već prethodno opisanu korekciju pri izvođenju maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) bakra za pojedino područje u skladu s izmjerenim prirodnim, pozadinskim koncentracijama.

## **2.4. Analiza i monitoring**

Standardne metode koje su danas na raspolaganju za mjerenje koncentracija bakra i njegovih spojeva u slatkim i slanim vodama brojne su i uključuju primjerice:

- ICP-MS (Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom)
- ICP-AES (Atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom)
- AAS (Atomska apsorpcijska spektroskopija)
- GFAAS (Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći)
- ASV (Anodna stripping voltametrija), i dr.

S obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije bakra u morskoj vodi 0.5 µg/L, te da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti navedenih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da su metode koje su na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.



### 3. Cink i njegovi spojevi – sažetak

Cink (Zn) je plavkastobijela sjajna kovina. Pri sobnoj je temperaturi krhak i lomljiv. Burno reagira s metalnim oksidima, a s kisikom i dušikom stvara velik broj kompleksnih spojeva. Amfoteran je, otapa se u kiselinama i jakim lužinama pa tvori soli. Ne korodira i na zraku je stabilan, jer se prevlači zaštitnim slojem oksida ili karbonata koji ga štiti od daljnje oksidacije i čini ga vrlo otpornim na utjecaj vlage, neutralnih i slabo lužnatih otopina. Dobar je vodič električne struje. Ima vrlo značajnu industrijsku primjenu i najviše se primjenjuje od svih obojenih kovina. Cink je jedan od najvažnijih biološki esencijalnih minerala. Prisutan je u tragovima u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, ključan za prenatalni i postnatalni razvoj u ljudi, strukturno važan u brojnim enzimima, metabolizmu DNA i RNA, regulaciji ekspresije gena i brojnim drugim biološkim procesima.

Cink i njegovi spojevi javljaju se u vodenom okolišu u suspendiranom i otopljenom obliku. Cink u vodi se može razdijeliti u nekoliko klasa, npr. hidratizirani cinkovi ioni, cinkovi ioni kompleksirani s organskim ligandima (huminske i fulvinske kiseline), i cink adsorbiran na čvrstu tvar. Njegova specijacija u okolišu je vrlo kompleksna, a u vodi postoji u oksidacijskom stanju +2 u oblicima koji su ovisni o fizikalno-kemijskim parametrima kao što je pH, tvrdoća vode i količina otopljenog organskog ugljika. Na bioraspoloživost i toksičnost mogu utjecati organske i anorganske kompleksacije, s anionima kao što su klorid (Cl<sup>-</sup>) i karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) i kompeticija s kationima (npr. Ca<sup>2+</sup> i H<sup>+</sup>) s cinkom na biološkim receptorima. Transport cinka u vodenom okolišu pod utjecajem je aniona. U prirodnim vodama kompleksirajuće tvari, kao što su huminske kiseline, mogu vezati cink.

Koncentracija cinka u površinskim vodama (slatkim i morskim) jako je ovisna o prirodnim geokemijskim uvjetima. Stoga je uslijed značajnih geokemijskih razlika nemoguće vjerodostojno odrediti prosječnu prirodnu pozadinsku koncentraciju cinka u europskim vodenim ekosustavima. Nadalje, kako su mjerene koncentracije suma antropogenih i prirodnih izvora teško se te kategorije mogu razdvojiti. Uobičajeno su koncentracije cinka u površinskoj morskoj vodi otvorenog oceana u rasponu od 0.001-0.06 µg/L, u dubokoj oceanskoj vodi 0.1 ± 0.4 µ/L, a u obalnim vodama 0.5-1 µg/L. Cink je široko rasprostranjen u europskim slatkim vodama u koncentracijama od 3-12 µg/L, a koncentracija cinka u slatkovodnom sedimentu je u rasponu od 70-175 µg/L.

I u slučaju cinka moguće je s obzirom na pozadinske koncentracije u okolišu za određivanje SKVO vrijednosti koristiti tzv. metodu dodanog rizika (engl. *added risk approach*). U ovom pristupu i predviđena koncentracija u okolišu (PEC vrijednost) i predviđena koncentracija koja nema toksičnog učinka (PNEC vrijednost) određuju se na temelju dodane koncentracije, u ovom slučaju cinka prisutnog u okolišu, što u konačnici rezultira tzv. "dodanim PEC" (PECadd), odnosno "dodanim PNEC" (PNECadd) vrijednostima. Prema tome, metoda dodanog rizika, koja se u načelu može koristiti za sve prirodne tvari, podrazumijeva da su samo antropogeni dodaci ispitivane tvari (tj. količina dodana u prirodnu pozadinsku koncentraciju) relevantni za procjenu učinka te tvari. U skladu s tim postavkama, maksimalna dopuštena koncentracija (MPC) u vodenom okolišu treba biti zbroj lokalne, prirodne ili pozadinske koncentracije ispitivane tvari i izvedene PNECadd, odnosno SKVO vrijednosti.

Sekundarno trovanje nije relevantno u slučaju procjene učinka cinka, jer mnoge životinje, koje pripadaju različitim taksonomskim skupinama, uspješno reguliraju razinu cinka u organizmu i održavaju homeostazu. Cink se umjereno biokoncentrira u vodenim organizmima, s time da je biokoncentracija u rakovima i školjkašima veća nego u riba. Cink se ne koncentrira u biljkama,

te se ne biomagnificira kroz terestrički hranidbeni lanac. Podaci o (eko)toksičnosti cinka, odnosno njegovih spojeva su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih toksikoloških *online* baza i izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih organizacija. Dostupni su podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti za različite taksonomske skupine slatkovodnih i morskih organizama. S obzirom na dostupne literaturne podatke rakovi i alge su najosjetljivije taksonomske skupine, a slijede spužve, kolnjaci i ribe. Rakovi su osjetljiviji na cinkove ione od riba i algi. Među morskim organizmima bodljikaši, rakovi i kolutićavci su najosjetljiviji kada je u pitanju kronična izloženost, dok se za akutnu izloženost cinku rezultati jako razlikuju.

Postojeći podaci u velikoj mjeri poklapaju se s našim istraživanjima obavljenima u okviru ove studije. Naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su rakovi najosjetljiviji organizmi na toksičnost cinka. Najniža LC50 vrijednost od 1.1 mg/L dobivena je za slatkovodnog planktonskog račića vrste *Daphnia magna*, potom slijedi jednostanična zelena alga vrste *Scenedesmus subspicatus* (2.11 mg/L), dok su najmanju osjetljivost na cink pokazali embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 82.79 mg/L.

U skladu s ovim podacima, PNECadd vrijednost za slatkovodne sustave i akutnu izloženost cinku i/ili njegovim spojevima temeljimo na najnižoj LC50 vrijednosti od 1.1 mg/L ustanovljenoj za planktonskog račića *D. magna*. Osim toga, s obzirom da dostupni literaturni podaci jasno pokazuju da su rakovi također među najosjetljivijim organizmima kada je u pitanju dugoročna izloženost, primjena umanjelog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne LC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost.

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti oslonili smo se na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost za slatkovodne organizme. Nadalje, kako se slatke i slane vode značajno razlikuju u pogledu različitih abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata, preporuka je da se za metale i metaloide ne kombiniraju podaci o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme. Stoga, kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti i u ovom slučaju uzeli smo raspoloživu podatke iz znanstvene literature, kao i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama cinku i/ili njegovim spojevima.

Cjeloviti pregled preporučenih SKVO vrijednosti za cink i njegove spojeve donosimo u Tablici 18.

**Tablica 18.** Sažetak preporučenih SKVO vrijednosti za cink i njegove spojeve.

Vodeni medij	Predložena PNEC (SKVO) vrijednost (µg/L)	
	akutna (kratkotrajna) izloženost	kronična (dugotrajna) izloženost
Slatke vode	110	14.2
Morske vode	7	3.4

U pogledu metodoloških zahtjeva vezanih uz analizu i monitoring cinka i njegovih spojeva, te s obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije cinka u morskoj vodi 0.7 µg/L, odnosno da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti raspoloživih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da su standardne metode koje su danas na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.

### 3.1. Rezultati

#### 3.1.1. Identitet

U Tablici 19. navedeno je kemijsko ime i CAS (*Chemical Abstract Service*) broj tvari koja je testirana, odnosno za koju su predloženi odgovarajuće SKVO vrijednosti temeljem ovog izvještaja.

**Tablica 19.** Tvar na koju se odnosi predmetni Izvještaj u ovom poglavlju je cink (Zn), testiran u divalentnom (ZnCl<sub>2</sub>) stanju.

Ime (kemijska oznaka)	CAS broj
Cink (Zn)	7440-66-6
Cinkov klorid (ZnCl <sub>2</sub> )	7646-85-7

#### 3.1.2. PNEC vrijednosti kao temelj za izvođenje SKVO za cink

U skladu s postojećim znanstvenim spoznajama i metodološkim postupcima opisanima u Tehničkom priručniku (*Technical Guidance Document*; u daljnjem tekstu TGD, 4) izdanom od strane Europske agencije za kemikalije (*European Chemicals Agency*; ECHA), temelj za izvođenje SKVO vrijednosti predloženih u ovom Izvještaju su PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) vrijednosti dobivene korištenjem tri testa akutne toksičnosti koji su uključivali različite modelne organizme, odnosno taksonomske skupine, kao što je opisano u poglavlju 3.

Pri tome je važno napomenuti da se PNEC vrijednosti za cink odnose na „dodane“ bioraspoložive koncentracije cinka na koncentracije koje su normalno prisutne u prirodnim vodama. Nadalje, iako bioraspoloživost i posljedična toksičnost cinka može biti modificirana

različitim promjenama u vodi ili kemijskim svojstvima sedimenta (pH, tvrdoća vode, otopljena organska tvar i sl.), usprkos vrlo obimnim istraživanjima dostupnim u svjetskoj literaturi do sada nema jednoznačnog zaključka o statistički značajnom utjecaju tih pokazatelja na (eko)toksičnost cinka (93). Stoga ovi pokazatelji nisu dodatno uzimani u obzir prilikom izvođenja SKVO vrijednosti.

### 3.1.3. Klasifikacija opasnosti

U Tablici 20. dani su podaci i međunarodno prihvaćene klasifikacijske oznake rizika za cink.

**Tablica 20.** Klasifikacija rizika za cink.

R-oznake i označavanje	Literatura
Cink, metal; N; R50-53; S60-61	93

### 3.1.4. Fizikalna i kemijska svojstva

U Tablici 21. navedena su ključna fizikalno-kemijska svojstva cinka.

**Tablica 21.** Fizikalno-kemijska svojstva cinka.

Svojstvo	Vrijednost	Literatura
Molekularna (kemijska) oznaka	Zn	
Tlak para	31 pri 450°C	93
Topivost u vodi	100 µg/L pri 20° i pH 6.93-8.57	94
Relativna molekulska masa	65.38	94

### 3.1.5. Prisustvo i sudbina cinka u okolišu

Podaci o pojavnosti, abiotičkoj sudbini i specijaciji cinka u okolišu su brojni i u narednim odlomcima donosimo sažeti pregled podataka važnih za ovaj Izvještaj:

Abiotička sudbina – cink i njegovi spojevi javljaju se u vodenom okolišu u suspendiranom i otopljenom obliku. Cink u vodi se može razdijeliti u nekoliko klasa, npr. hidratizirani cinkovi ioni, zinkovi ioni kompleksirani s organskim ligandima (huminske i fulvinske kiseline), cink oksidni ion, te cink adsorbiran na čvrstu tvar.

Specijacija u okolišu – vrlo je kompleksna i ovisna o abiotičkim čimbenicima kao što su pH, sadržaj organske tvari, redoks potencijal i sl. Specijacija je važna za migraciju cinka kroz sediment, distribuciju cinka u topivim i netopivim oblicima, te za unos u organizme vodenog stupca ili sedimenta. Cink u vodi postoji u oksidativnom stanju +2 u oblicima koji su ovisni o fizikalno-kemijskim parametrima kao što je pH, tvrdoća vode i količina otopljenog organskog ugljika. Na bioraspoloživost i toksičnost mogu utjecati organske i anorganske kompleksacije, s anionima kao što su klorid (Cl<sup>-</sup>) i karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) i kompeticija s kationima (npr. Ca<sup>2+</sup> i H<sup>+</sup>) s cinkom na biološkim receptorima.

Distribucija u sustavima voda/sediment – u vodi se cink pojavljuje primarno kao divalentni kation. Disocira u kiselinama te tvori hidratizirani  $Zn^{2+}$  kation te u jakim bazama tvori zinkat anione koji su hidrookso kompleksi. Suspendirani cink može disocirati ovisno o promjenama uvjeta (npr., pH, redoks potencijal) ili se može adsorbirati na suspendiranu tvar. U vodenom okolišu cink se distribuira na sediment ili suspendirane čvrste tvari kroz sorpciju na hidrirano željezo ili manganove okside, minerale gline i organski materijal. Sadržaj cinka u sedimentu usko je koreliran s dubinom, organskim sadržajem i sadržajem gline u sedimentu. Fosfati i željezovi hidroksidi utječu na transfer metala iz vodenog stupca u sediment. Transport cinka u vodenom okolišu pod utjecajem je aniona. U prirodnim vodama kompleksirajuće tvari, kao što su huminske kiseline, mogu vezati cink. Stabilnost cinkovih kompleksa ovisi o pH vode i prirodi kompleksa. Kako se pH vode smanjuje ( $pH < 7$ ) tako se koncentracija cinkovih iona u vodenoj fazi povećava jednakom brzinom kao i otpuštanje cinka iz sedimenta (95).

Stupanj degradacije u tlu – Cink ne isparava iz tla, a jedini slučajevi ispiranja zabilježeni su na odlagalištima otpada. Cink se čvrsto veže za čestice tla. Mobilnost cinka u tlu ovisi o oblicima tog elementa u tlu, kao i o svojstvima tla kao što su kationski izmjenjivački kapacitet, pH, redoks potencijal, te kemijske vrste prisutne u tlu. Mobilnost cinka u tlu se povećava sa smanjivanjem vrijednosti pH pod oksidirajućim uvjetima i kod manjeg kationskog izmjenjivačkog kapacitea tla. Kod vapnenih tala odnos topivosti cinka i pH vrijednosti nije linearan. Pri visokim pH cink u otopini precipitira kao  $Zn(OH)_2$ , ili cinkov karbonat ( $ZnCO_3$ ). Glina i metalni oksidi mogu sorbirati cink i usporiti njegovu mobilnost u tu. Cink uobičajeno ostaje u rekalcitrantnim, imobilnim oblicima u zagađenom tlu.

Prirodne koncentracije cinka u okolišu – koncentracije cinka u površinskim vodama (slatkim i morskim) ovisne su o prirodnim uvjetima te je nemoguće eksperimentalno odrediti prirodnu pozadinsku koncentraciju u Europi zbog značajnih geokemijskih razlika. Nadalje, kako su mjerene koncentracije suma antropogenih i prirodnih izvora teško se te kategorije mogu razdvojiti. Uobičajeno su koncentracije cinka u površinskoj morskoj vodi otvorenog oceana u rasponu od 0.001-0.06  $\mu\text{g/L}$ , u dubokoj oceanskoj vodi  $0.1 \pm 0.4 \mu\text{g/L}$ , a u obalnim vodama 0.5-1  $\mu\text{g/L}$ . Cink je široko rasprostranjen u europskim slatkim vodama u koncentracijama od 3-12  $\mu\text{g/L}$ . Koncentracija cinka u slatkovodnom sedimentu je u rasponu od 70-175  $\mu\text{g/L}$  (96).

Biološka transformacija – cink može stvarati komplekse s različitim organskim i anorganskim skupinama (ligandima). Biološka aktivnost može utjecati na mobilnost cinka u vodenom okolišu, iako biote sadrže relativno malo cinka u odnosu na sediment. Biološka razgradnja cinkovih kompleksa u tlu nužna je za normalno funkcioniranje ekoloških sustava kako bi se olakšalo recikliranje cinka iz biljnih ostataka, fecesa ili uginulih organizama. U nekim okolišima, bakterije i gljivice su sposobne oksidirati cinkov sulfid proizvodeći cinkov sulfat koji se može otopiti u otopini tla.

Bioakumulacija i biokoncentracija – prema izvještaju Europske komisije iz 2010 (93) o bioakumulaciji cinka u životinjama i biokoncentraciji, zaključeno je kako sekundarno trovanje nije relevantno u slučaju procjene učinka cinka. Razlog tome je što mnoge životinje, koje pripadaju različitim taksonomskim skupinama, uspješno reguliraju razinu cinka u organizmu i održavaju homeostazu. Cink se umjereno biokoncentrira u vodenim organizmima, s time da je biokoncentracija u rakovima i školjkašima veća nego u riba. Cink se ne koncentrira u biljkama, te se ne biomagnificira kroz terestrički hranidbeni lanac.

### 3.1.6. Dostupni podaci o (eko)toksičnosti cinka

Podaci o (eko)toksičnosti cinka su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih organizacija. Najvažniji i najkompletniji podaci mogu se naći u javno dostupnim publikacijama, a pri tome su za svrhu ovog Izvješća najvažniji slijedeći izvori:

- Water Framework Directive - United Kingdom Technical Advisory Group (WFD-UKTAG), Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: zinc, 2010 (96)
- European Union Risk Assessment Report - Zinc Metal (2010) JRC61245 (93)
- US EPA Zinc: Ambient Water Quality Criteria (1995) (98)

Navedeni izvori upotpunjeni su pretraživanjem najnovije znanstvene literature (putem Web of Science i Scopus baza podataka) i preglednih znanstvenih publikacija vezanih uz ekotoksičnost cinka i njegovih spojeva (99, 100, 101).

Najsveobuhvatniji pregled dosadašnjih istraživanja o ekotoksičnosti cinka i njegovih spojeva u vodenom okolišu, uz preglednu procjenu istraživanja provedenih do 2007. god., dostupan je u relevantnom izvješću EU (93). Studije i istraživanja koje su publicirane u međuvremenu nisu rezultirale nekim značajno novim saznanjima, stoga za detaljniji pregled upućujemo posebno na tu publikaciju. Za svrhu ovog Izvješća ukratko ćemo navesti najvažnija saznanja o toksičnosti cinka, odnosno njegovih spojeva, za slatkovodne i morske organizme.

Toksičnost za slatkovodne organizme – dostupni su podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti za različite taksonomske skupine, uključujući alge, vodozemce, rakove, ribe, kukce, mekušce, kolnjake i spužve. Alge su najosjetljivija taksonomska skupina, a slijede ju rakovi, spužve, kolnjaci i ribe. Rakovi su osjetljiviji na cinkove ione od riba i algi (97).

Toksičnost za morske organizme – dostupni su podaci o kroničnim i akutnim toksičnim učincima na alge, kolutičavce, žarnjake, rakove, bodljikaše, ribe, mekušce i oblice. Bodljikaši, rakovi i kolutičavci su najosjetljiviji organizmi kada je u pitanju kronična izloženost, dok se podaci za akutnu izloženost cinku rezultati jako razlikuju. RIBE su u pogledu akutne izloženosti općenito manje osjetljive od beskralježnjaka (97).

### 3.1.7. Mehanizam toksičnosti cinka i njegovih spojeva

Osnovni mehanizam za akutnu toksičnost cinka za slatkovodne ribe je inhibicija unosa kalcija (102). Iako potencijalno toksični element, cink je esencijalan za sve poznate životne oblike. Cink je kofaktor 10% svih proteina i funkcionira kao paracelularna i intracelularna signalna tvar. Akutno izlaganje cinku također dovodi do metaboličke acidoze kroz stimulaciju ukupne branhijalne ekskrecije amonijaka i unosa kiselih ekvivalenata iz vode. Za razliku od slatkovodnih riba mehanizam akutne toksičnosti cinka za morske ribe je gotovo nepoznat. Iako morske ribe uzimaju kalcij preko škrga, kao i slatkovodne vrste, kako je koncentracija kalcija u morskoj vodi 10 puta veća od one u krvnoj plazmi, hipokalcemija zbog inhibicije unosa kalcija ne čini se vjerojatnom. Isti je mehanizam opisan i za slatkovodne rakove (*Daphnia magna*) kod kojih cink također inhibira unos kalcija, što rezultira reduciranim sadržajem kalcija u organizmu. Organizmi posljedično ugibaju zbog hipokalcemije. Pri subletalnom smanjenju kalcija u tijelu pokretanje i brzina filtracije su inhibirani, što dovodi do smanjenja hranjenja.

Posljedično organizmi imaju manje energije što rezultira reduciranim rastom i reprodukcijom (103).

### 3.2. Izvođenje SKVO za cink

#### 3.2.1. Korištenje pristupa dodanog rizika (engl. *added risk approach*)

Korištenje pristupa dodanog rizika je odgovarajuće kada se deriviraju PNEC vrijednosti za cink zbog toga što se cink prirodno pojavljuje te su njemu organizmi bili izloženi tijekom cjelokupnog evolucijskog perioda. Nadalje, cink je široko rasprostranjen u vodenom okolišu. U ovom pristupu, i predviđena koncentracija u okolišu (PEC vrijednost) i predviđena koncentracija koja nema toksičnog učinka (PNEC vrijednost) određuju se na temelju dodane koncentracije, u ovom slučaju cinka prisutnog u okolišu, što u konačnici rezultira tzv. "dodanim PEC" (PECadd), odnosno "dodanim PNEC" (PNECadd) vrijednostima. Prema tome, metoda dodanog rizika, koja se u načelu može koristiti za sve prirodne tvari, podrazumijeva da su samo antropogeni dodaci ispitivane tvari (tj. količina dodana u prirodnu pozadinsku koncentraciju) relevantni za procjenu učinka te tvari. Dakle, zanemaruje se doprinos prirodne pozadinske koncentracije na toksične učinke.

U skladu s tim postavkama, maksimalna dopuštena koncentracija (MPC) u vodenom okolišu ili sedimentu je zbroj lokalne, prirodne ili pozadinske koncentracije ispitivane tvari prirodne pozadine (Background vrijednost) i PNECadd vrijednosti.

U tom slučaju, **PNECadd vrijednost je približno ekvivalentna SKVO vrijednosti:**

$$\text{MPC} = \text{PNECadd} + \text{Cbackgrnd} \quad (\text{PNECadd} \approx \text{EQS})$$

$$\text{PECadd} = \text{EC} - \text{Cbackgrnd} \quad (\text{EC} = \text{stvarna okolišna koncentracija na mjestu X})$$

Ovaj pristup pri tome se temelji na dvi je ključne pretpostavke:

- 1) stupanj do kojeg pozadinska koncentracija metala ima utjecaj na strukturu i funkciju ekosustava nije relevantna. Bilo koji, potencijalno negativan ili pozitivan učinak pozadinske koncentracije, može se smatrati učinkom koji doprinosi prirodnoj biološkoj raznolikost ekosustava;
- 2) Budući da su vrste u ekosustavu prilagođene prevladavajućoj pozadinskoj koncentraciji, pretpostavlja se da ista količina metala dodana antropogenim djelovanjem u načelu uzrokuje isti učinak. U takvim okolnostima, međutim, svi okolišni parametri koji određuju toksičnost metala moraju biti jednaki, osim razine pozadinske koncentracije predmetnog metala (tj. nije apsolutna razina metala ta koja je odlučujuća za opseg štetnih učinaka, već samo dodana koncentracija).

Nadalje, pozadinske koncentracije i PNECadd su neovisno izvedene vrijednosti. Stvarne pozadinske koncentracije mogu se izvesti na temelju podataka o praćenju za relativno netaknute površine ili se temelje na izračunima pomoću geoloških i hidroloških podataka. I konačno, korištenje pristupa dodanog rizika podrazumijeva da u ispitivanom okolišu nema rizika od nedostatka esencijalnih metala na razini izračunatog standarda kakvoće. Prema

definiciji, pozadinska koncentracija u danom ekosustavu osigurava prisutnim organizmima potrebne esencijalne metale.

### 3.3. Izračun PNEC vrijednosti kao temelja izvođenje SKVO za cink

#### 3.3.1. Pozadinske (okolišne) koncentracije cinka u Hrvatskoj

Koncentracije cinka mjerene su na području rijeke Save, a koncentracije su se kretale od 0.09 do 8.74 µg/L (70, 105, 106). Tijekom 2014. godine mjerenja su izvršena na lokacijama Zagreb, Jasenovac, Slavonski Brod te Županja, a koncentracije cinka kretale su se od 1.14-3.31 µg/L (Zagreb), 0.53-0.64 (Jasenovac), 0.99-10.7 µg/L (Slavonski Brod) te 2.96-3.72 µg/L (Županja) (106).

Rezultati kemijskog monitoringa na 3 lokacije na području RH: Veličanka 2 (Istočna Slavonija), Bukovska Dobra (Gorski kotar) i Sutla-Lupinjak (sjeverni dio RH) pokazuju da su vode s istraživanih voda s obzirom na koncentraciju cinka uglavnom u I. kategoriji (koncentracija cinka manja od 50 µg/L), osim Bukovske dobre u kojoj se u zimskom periodu koncentracija povećala te je pripadala u II. kategoriju (koncentracija cinka u rasponu od 50-80 µg/L) (90).

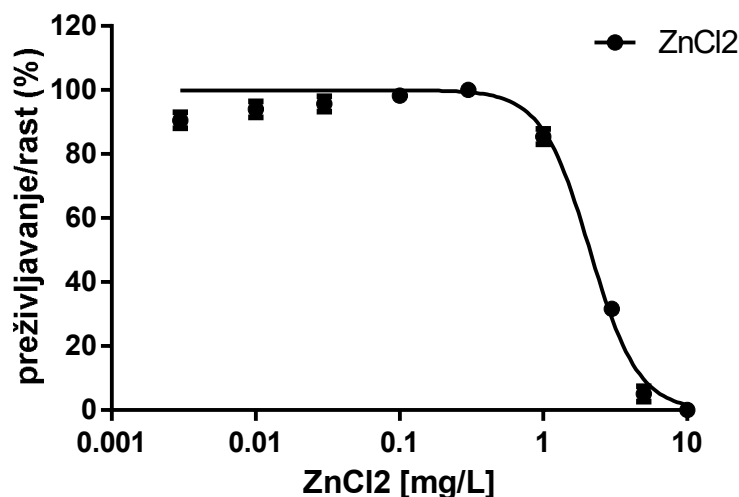
Za morske vode dostupna su mjerenja koncentracije cinka na području oko ušća rijeke Krke, s izmjerenim koncentracijama cinka od 0.22 (Krka-Skradinski Buk) do 14.52 (Krka – Knin) µg/L (69). Mjerenja na području grada Šibenika pokazuju niže prosječne izmjerene vrijednosti od 1.34 µg/L (89).

#### 3.3.2. PNEC za slatkovodne sustave – akutno izlaganje

S obzirom na dostupne literaturne podatke rakovi se pojavljuju kao najosjetljivija taksonomska skupina u odnosu na ekotoksičnost cinka s LC50 vrijednošću od 76 µg/L nakon 48 sati izlaganja za slatkovodnog račića vrste *Daphnia magna*. Slijede alga *Selenastrum capricornutum* s EC50 vrijednošću od 136 µg/L cinka nakon 72 sata izlaganja, te najmanje osjetljive ribe (*Oncorhynchus mykiss*) a EC50 vrijednošću od 170 µg/L za 96 sati izlaganja (97).

Kao što se može uočiti na slikama 12. – 15., te tablicama 22. – 24., naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola ukazuju na manju osjetljivosti testiranih organizama na cink. Najniža LC50 vrijednost od 1.1 mg/L dobivena je za slatkovodnog planktonskog račića vrste *Daphnia magna*, potom slijedi jednostanična zelena alga vrste *Scenedesmus subspicatus* (2.11 mg/L), dok su najmanju osjetljivost na cink pokazali embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 82.79 mg/L.

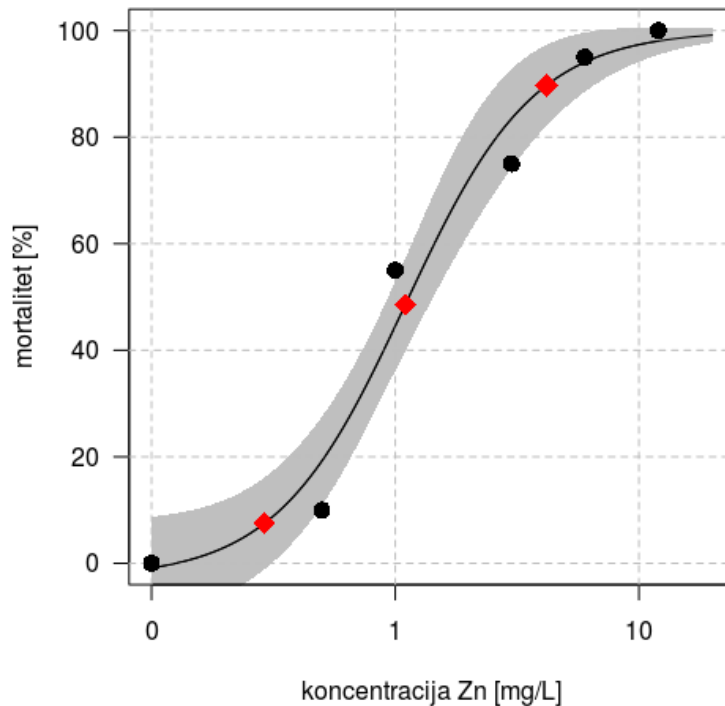




**Slika 12.** Određivanje akutne toksičnosti cinka (testirana tvar  $ZnCl_2$ ) AlgalTox testom mjerenjem preživljavanja, odnosno inhibicije rasta jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5). Preživljavanje, odnosno rast algi u prisustvu različitih koncentracija  $ZnCl_2$  određeno je nakon 96 h izlaganja i izraženo u % ( $\pm$  SD rezultata mjerenja uzoraka u triplikatu; SD nije prikazana u slučaju kada je  $< 5\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu algi izlaganu bez dodatka cinka (preživljavanje/rast 100%). Prikazan je tipičan rezultat pokusa izvedenog u 4 nezavisna ponavljanja.

**Tablica 22.**  $EC_{50}$  vrijednost  $ZnCl_2$  (koncentracija testne tvari koja uzrokuje 50% smanjenje preživljavanja/rasta algi u odnosu na kontrolnu skupinu izlaganu bez dodatka testne tvari) za algu vrste *Scenedesmus subspicatus*, s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti. Vrijednosti prikazane u tablici kalkilirane su na temelju rezultata 4 nezavisna pokusa.

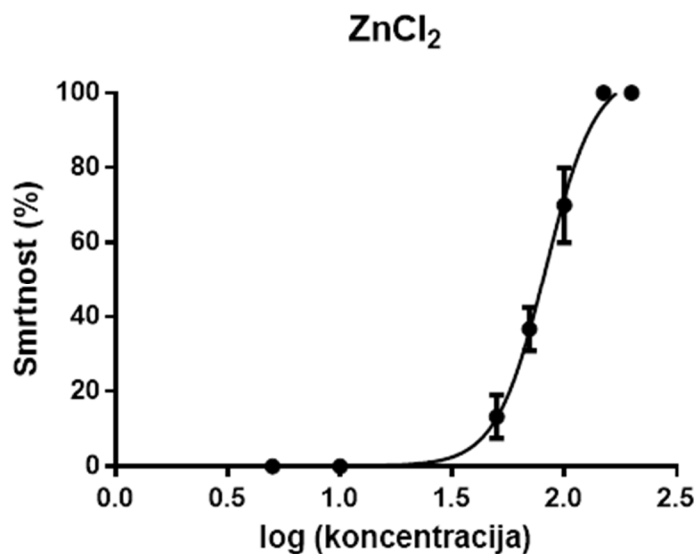
Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica) [ $\mu$ g/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica) [ $\mu$ g/L]
$EC_{50}$	2.11	0.28	1.86	2.39



**Slika 13.** – Mortalitet (48 h) *Daphnia magna* pri različitim koncentracijama cinka (testirana tvar: ZnCl<sub>2</sub>). Sivo područje oko doza-odgovor krivulje pokazuje 95% interval pouzdanosti. Crvenim točkama označene su procijenjene LC<sub>10</sub>(48 h), LC<sub>50</sub>(48 h) i LC<sub>90</sub>(48 h) vrijednosti.

**Tablica 23.** – Procijenjene letalne koncentracije cinka (Zn) za 10%, 50% i 90% populacije *Daphnia magna* - LC<sub>10</sub>(48 h), LC<sub>50</sub>(48 h) i LC<sub>90</sub>(48 h) sa pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti procijenjenih parametara.

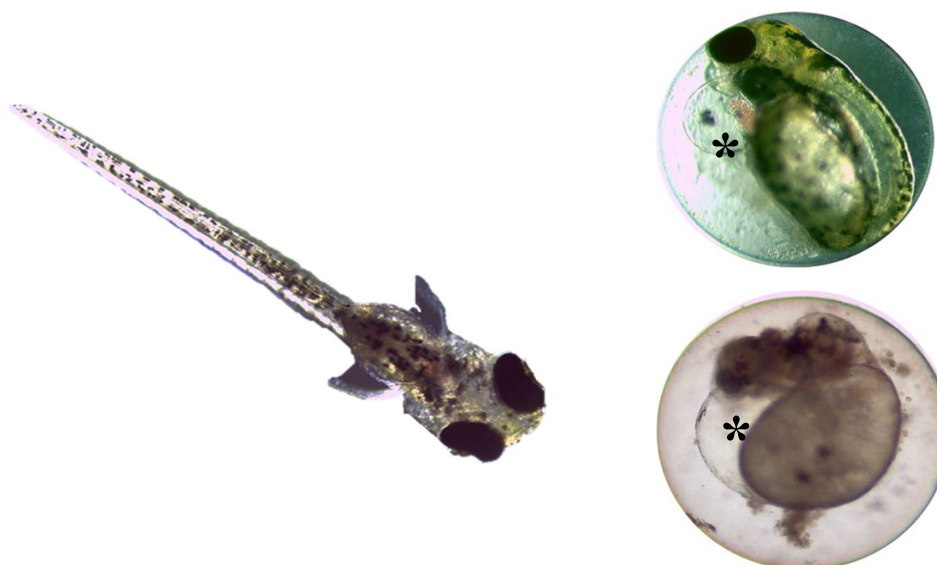
Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>10</sub>	0.290	0.067	0.152	0.429
LC <sub>50</sub>	1.101	0.134	0.822	1.380
LC <sub>90</sub>	4.177	1.011	2.075	6.280



**Slika 14.** - Prikaz toksičnosti na zebricama (*Danio rerio*) u ovisnosti o koncentraciji cinka (Zn) testirana tvar: ZnCl<sub>2</sub>). Mortalitet označava postotak umrlih embrija 96 hpf.

**Tablica 24.** Procijenjena LC<sub>50</sub> koncentracija cinka (Zn) za zebriće (*Danio rerio*) s pripadajućim vrijednostima 95% intervala pouzdanosti.

Parametar	Koncentracija [mg/L]	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>50</sub>	82.79	77.26	88.56



**Slika 15.** Prikaz razvojnih abnormalnosti nastalih nakon 96 h izlaganja embrija zebriće (*Danio rerio*) cinku (testirana tvar: ZnCl<sub>2</sub>). a) kontrola prikazuje normalno razvijen embrij 96 hpf, b) perikardijalni edem (zvjezdica), c) deformiran embrio s razvijenim edemom (zvjezdica).

U skladu s ovim podacima, PNECadd vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost cinku temeljimo na najnižoj izmjerenoj LC50 vrijednosti od 1.1 mg/L (Tablica 23.), kao što je preporučeno u smjernicama u TGD dokumentu EU (4). Osim toga, s obzirom da dostupni literaturni podaci jasno pokazuju da su rakovi također među najosjetljivijim organizmima kada je u pitanju dugoročna izloženost, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne LC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost. U tom slučaju, određena PNEC vrijednost trebala bi spriječiti bilo koje značajnije toksične učinke u slučaju akutne izloženosti i pojave kratkotrajnih visokih koncentracija cinka u vodenom okolišu.

Zaključno:

**PNECadd, slatkovodni-akutno izlaganje = 1.1 mg/L / AF (10) = 110 µg/L otopljenog cinka**

### 3.3.3. PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost cinku i/ili njegovim spojevima.

S obzirom na srednje NOEC vrijednosti po testiranim vrstama iz literature nije moguće izvući jednoznačan odgovor za moguće razlike u osjetljivosti među različitim taksonomskih skupinama. Razlike dobivene u istraživanjima predstavljenima u literaturi potječu od limitiranog broja pokusa, te razlikama u dizajnu, testnim uvjetima i porijeklu ispitivanog organizma. NOEC vrijednosti nakon izloženosti cinku ribe *Onchorhynchus mykiss* kretale su se od 25 do 974 µg/L, za algu *Pseudokirchneriella subcapitata* 4.9-124 µg/L i za slatkovodnog račića vrste *Daphnia magna* 48-155 µg/L (104). Iz svega navedenog čini se da su u slučaju dugotrajnog izlaganja jednostanične alge nešto osjetljivije na ione cinka nego slatkovodni račići i ribe.

Nadalje, u dostupnoj literaturi PNEC vrijednost se temelji na ekstrapolaciji korištenjem tzv. SSD (engl. *species sensitivity distribution*) pristupa na temelju kroničnih NOEC vrijednosti normaliziranih na fizikalno-kemijske pokazatelje kvalitete vode koja reflektira zaštitu 95% europskih vodotokova. Parametri kvalitete vode korišteni su da bi se odredila razina zaštite za predložene PNEC za cink prema slijedećim kriterijima:

- za sve vrste 10% europskog DOC-a; beskralježnjaci i ribe: 10% anorganskih parametara (uključujući pH i tvrdoću); alge: 90% anorganskih parametara;
- NOEC normaliziran na fizikalno-kemijske parametre HC5=14.2 µg/L biorasploživog cinka;
- AF1.

S obzirom na navedeno, u do sada najvjerodostojnijem Izvještaju UK Environment Agency usmjerenom određivanju SKVO vrijednosti za cink (97), preporučeno je da se izvođenje PNECadd vrijednosti temelji na najnižoj i vjerodostojno određenoj LOEC vrijednosti od 14.2 µg/L zabilježenoj za jednostanične alge vrste *Pseudokirchneriella subcapitata*. Prema tome, u

skladu s uputama danim u TGD (5), NOEC vrijednost treba biti izvedena dijeljenjem LOEC vrijednosti s 2. Nadalje, s obzirom da su rezultati kronične izloženosti cinku za najmanje tri taksonomski različite kategorije raspoloživi, odgovarajući faktor procjene (AF) koji treba primijeniti na najnižu izvedenu NOEC vrijednost je 1. Što znači da je PNECadd vrijednost za slatkovodne sustave, za kroničnu izloženost izvedena kako slijedi:

$$\text{PNECadd, slatkovodni sustavi-kronična izloženost} = 14.2 \mu\text{g/L} / (\text{AF } 1) = 14.2 \mu\text{g/L}$$

**otopljenog cinka**

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost cinku u slatkovodnim ekosistemima. Međutim, iznimno je važno napomenuti da prema postavkama obrazloženima u poglavlju 1.2.1., maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) cinka za pojedino područje moraju biti izvedene tako da se određenoj SKVO (PNECadd) vrijednosti pridoda pozadinska koncentracija cinka ustanovljena na godišnjoj razini za predmetno područje. Nadalje, prilikom određivanja PNEC, odnosno MPC vrijednosti za određeno područje, potrebno je uzeti u obzir, odnosno izvršiti odgovarajuće korekcije prema godišnjim prosjecima za pH, otopljeni organski ugljik (DOC) i stupanj karbonatne tvrdoće vode (97).

#### 3.3.4. PNEC za morske vode

Slatke i slane vode se značajno razlikuju u pogledu različitih abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata. Za metale i metaloide preporuka je ne kombinirati podatke o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme, već izvoditi PNEC vrijednosti na temelju raspoloživih podataka o toksičnim učincima za slatkovodne organizme.

Kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se prema tome osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama cinku.

PNEC za kroničnu (dugotrajnu) izloženost – morske alge ponovo su se pokazale kao najosjetljiviji organizmi, a NOEC vrijednosti su unutar taksonomskih skupina pokazivale veliki raspon vrijednosti. Dodatno, za morske organizme nema puno istraživanja vezanih za toksičnost cinka. Osim algi kao vrlo osjetljivima pokazali su se i bodljikaši (NOEC 10  $\mu\text{g/L}$ ) (96).

Temeljem ovih i sličnih istraživanja, kao i činjenice da su na raspolaganju rezultati istraživanja kronične toksičnosti cinka na različitim (najmanje tri) taksonomskim skupinama (alge, rakovi, bodljikaši, mekušci, kolutičavci), preporuka je da se PNECadd vrijednost za morske vode temelji na najnižoj zabilježenoj NOEC vrijednosti od 5.6  $\mu\text{g/L}$  za raka *Holmesimyis costata*. No s obzirom da postoje podaci o kroničnoj ekotoksičnosti cinka za 36 vrsta, moguće je izračunati njihovu geometrijsku sredinu. Stoga je HD5 od 6.75  $\mu\text{g/L}$  Zn i primjena faktora procjene (AF) od 2 primjerena za morsku vodu (96).

Zaključno:

**PNECadd, morske vode-kronična izloženost = 6.75 µg/L / AF (2) = 3.4 µg/L otopljenog cinka**

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost cinku u morskim ekosistemima, uz već prethodno opisanu korekciju pri izvođenju maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) cinka za pojedino područje u skladu s izmjerenim prirodnim, pozadinskim koncentracijama, te vrijednostima za pH, DOC i karbonatnu tvrdoću.

PNEC za akutnu (kratkotrajnu) izloženost – prema dostupnim literaturnim podacima najosjetljivije na toksičnost cinka su alge s izračunatim NOEC vrijednostima od 7 µg/L (*Asterionella japonica* i *Skeletonema costatum*) (107). Trpovi se također vrlo osjetljivi na toksičnost cinka, NOEC 7.2 µg/L (*Heliocidaris crassispina*) i EC10(72h) 9.7 µg/L (*Evechinus chloroticus*). Spužve i rakovi manje su osjetljivi, s ustanovljenim NOEC vrijednostima od 43 µg/L Zn (spužva *Dysidea fragilis*), odnosno 169 µg/L za raka vrste *Chionoecetes bairdi* (97).

Temeljem dostupnih literaturnih podataka, kao i činjenice da su na raspolaganju rezultati istraživanja kronične toksičnosti cinka na različitim (najmanje tri) taksonomskim skupinama (alge, spužve, rakovi, bodljikaši), preporuka je da se PNECadd vrijednost za morske vode temelji na najnižoj zabilježenoj NOEC vrijednosti od 7 µg/L za alge vrsta *Asterionella japonica* i *Skeletonema costatum*, uz primjenu faktora procjene (AF) od 1.

Zaključno:

**PNECadd, morske vode-akutna izloženost = 7 µg/L / AF (1) = 7 µg/L otopljenog cinka**

Navedenu vrijednost moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju kratkotrajna (akutna) izloženost cinku u morskim ekosistemima, uz već prethodno opisanu korekciju pri izvođenju maksimalne dopuštene koncentracije (MPC vrijednosti) cinka za pojedino područje u skladu s izmjerenim prirodnim, pozadinskim koncentracijama.

### **3.4. Analiza i monitoring**

Standardne metode koje su danas na raspolaganju za mjerenje koncentracija cinka i njegovih spojeva u slatkim i slanim vodama brojne su i uključuju primjerice:

- ICP-MS (Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom)
- ICP-AES (Atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom)
- AAS (Atomska apsorpcijska spektroskopija)
- GFAAS (Atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći)
- ASV (Anodna stripping voltametrija), i dr.

S obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije cinka u morskoj i slatkoj vodi 3.4 µg/L, te da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50%, a aktualni detekcijski limiti navedenih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da

su metode koje su na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.

### 3.5. **Zaključci i napomene**

Prije nego se PNEC vrijednosti usvoje kao SKVO vrijednost potrebno je adresirati slijedeće:

- Za implementaciju predloženih PNEC vrijednosti koristeći pristup dodanog rizika biti će potrebno odrediti pozadinske koncentracije cinka na regionalnoj razini, na razini riječnog sliva ili moguće na razini vodenog tijela.

#### 4. Krom i njegovi spojevi – sažetak

Krom (Cr) je srebrnobijeli metal plavkasta odsjaja. Nema mirisa ni okusa, a podatan je za kovanje. U dodiru s kisikom, zrakom ili vodenom parom prevlači se vrlo tankim slojem oksida otpornim na koroziju. Nije topljiv u dušičnoj kiselini i zlatotopci, sporo se otapa u hladnoj klorovodičnoj i sumpornoj kiselini, a u vrućima puno brže. Na povišenim temperaturama reagira s mnogim nemetalima. Nije otrovan, ali su otrovni njegovi spojevi, posebice kromna kiselina i alkalijski dikromati. Ima značajnu industrijsku primjenu, posebice kao legirani metal u proizvodnji nehrđajućih čelika, za elektrolitičko prevlačenje površina metala i nemetala (kromiranje), za proizvodnju kermeta itd. Krom je esencijalni mineral potreban za normalan metabolizam ugljikohidrata i masti.

Krom je u okolišu prisutan u svakom od oksidacijskih stanja, od -2 do +6, ali je u prirodi prisutan samo u elementarnom stanju (0), te u oksidacijskim stanjima +2, +3 i +6. U vodenoj fazi krom dolazi ili u topljivom stanju ili adsorbiran na suspendirane čestice. Otopljeni Cr(VI) može se relativno dugo zadržati u nekim vodenim tijelima, ali će na kraju biti reduciran na Cr(III) organskom tvari ili drugim redukcijskim tvarima koje su prisutne u vodi. Spojevi kroma ne isparavaju iz vode. Termodinamički stabilan oblik kroma u vodi je Cr(VI). Međutim, sporost postizanja ravnotežnog stanja, kao i utjecaj drugih prisutnih tvari i bioloških procesa može voditi do prisustva značajnih koncentracija reduciranog Cr(III) u većini prirodnih voda. Adsorpcija Cr(III) na čestice suspendirane tvari i sediment povećava se s povećanjem pH, u suprotnosti s ponašanjem Cr(III) vrsta čija se adsorpcija smanjuje s povećanjem pH.

U pogledu biološke transformacije, faktori koji utječu na mikrobnu redukciju Cr(VI) u Cr(III) uključuju koncentraciju biomase, početnu koncentraciju Cr(VI), temperaturu, pH, izvor ugljika, redoks potencijal te prisustvo oksianiona i metalnih kationa. Iako su visoke razine Cr(VI) toksične za većinu mikroorganizama, identificirano je i nekoliko rezistentnih sojeva bakterija. Iako se generalno ne očekuje biomagnifikacija kroma u hranidbenim lancima vodenih ekosistema, u brojnim studijama određeni su vrlo različiti biokoncentracijski faktori (BCF) za Cr(III) i/ili Cr(VI) i/ili ukupni Cr.

Koncentracije kroma zabilježene u rijekama i slatkovodnim sustavima kreću se između 1 i 10 µg/L. U oceanima i morima koncentracije se tipično kreću između 0.5 i 1 µg/L, a najčešće su manje od 1 µg/L. Gotovo sav Cr(VI) u okolišu potječe od antropogenih aktivnosti. U anaerobnim uvjetima i pri višem pH (7.8 i iznad), Cr(VI) je čini se stabilniji prema reduciranju nego pri nižem pH, i u takvim uvjetima u površinskim vodama Cr(VI) je relativno stabilan. Slično tome, Cr(VI) je stabilan i u aerobnim sedimentima i tlima, iako je pri tome relativno mobilan. Posljedično, Cr(VI) može migrirati u anaerobne slojeve, gdje se može dogoditi redukcija u Cr(III). Prema tome, pri aerobnim uvjetima brzina redukcije Cr(VI) u Cr(III) može biti ograničena brzinom transporta iona kroma u okoliš. Pri obrnutim uvjetima (primjerice alkalni pH viši od 8) i/ili neutralnom pH, u kojima je prisutna niska koncentracija reducensa za Cr(VI), brzina redukcije Cr(VI) u Cr(III) bit će niska, s vremenom poluživota oko 1 god. Takvi uvjeti mogu se naći u slanoj vodi gdje je pH tipično oko 8. U konačnici, postoji globalni okolišni ciklus kruženja kroma iz stijena i tala u vodu, biotu, zrak i natrag u tlo. Međutim, značajna količina kroma (procjena oko  $6.7 \times 10^6$  kg/god.) preusmjerava se ispuštanjem u vodotoke te oborinama i daljnjim otjecanjem u more, a krajnji repozitorij je oceanski sediment.

S obzirom na (ne)topljivost elementarnog Cr i Cr(III) spojeva, te ograničen unos Cr(III) u stanice, oni se ne smatraju posebnim (eko)toksičnim rizikom, dok su karcinogena svojstva Cr(VI) dugo poznata. Iako su neka *in vitro* istraživanja pokazala da visoke koncentracije Cr(III) spojeva u



stanici mogu dovesti do oštećenja DNA, smatra se da umjereni unos Cr(III) ne predstavlja genotoksični rizik. Za razliku od Cr(III), akutna toksičnost Cr(VI) uzrokovana je njegovim snažnim oksidacijskim svojstvima, a kod sisavaca je ustanovljena u rasponu od 50 do 150 µg/kg. Nakon ulaska u optjecajni sustav Cr(VI) oksidacijskim reakcijama izravno oštećuje tkiva i stanice.

Podaci o (eko)toksičnosti kroma, odnosno njegovih spojeva su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih toksikoloških *online* baza i izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih organizacija. Vrlo opsežni podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti dostupni su za različite taksonomske skupine (alge, rakove, slatkovodne i morske ribe, vodozemce, biljke), životne stadije (juvenilni stadiji, odrasle jedinke, ličinke, jaja i sl.), toksikološke krajnje točke mjerenja (LC50, EC50, NOEC, LOEC) i uvjete pokusa. S obzirom na stabilnost, biološku raspoloživost i pretežito antropogeno porijeklo većina dostupnih podataka odnosi se na toksičnost Cr(VI) spojeva. Alge, planktonski račići i ribe su najosjetljiviji organizmi u odnosu na kroničnu izloženost, a alge i račići također su najosjetljiviji na akutno izlaganje kromu, odnosno njegovim spojevima. U posebno osjetljive skupine spadaju i vodozemci i kukci. Nažalost, vrlo je malo vjerodostojnih ekotoksikoloških podataka za morske organizme izložene Cr(III) spojevima. Nadalje, iako je odnos između tvrdoće vode i toksičnosti divalentnih kationa dugo poznat i relativno dobro opisan fenomen, činjenica da se u slučaju spojeva kroma u vodi radi o oksoanionima ukazuje da je njihova toksičnost vrlo malo ovisna o fizikalno-kemijskim svojstvima vode. Stoga, s obzirom da detaljni odnosi između toksičnih svojstava kroma i njegovih spojeva i okolišnih faktora nisu vjerodostojno obrađeni u dostupnim izvorima, te da dostupni podaci ne omogućavaju i/ili opravdavaju normalizaciju akutne toksičnosti Cr(VI) prema tvrdoći vode ili pH vrijednostima, moguće je jedino izvoditi relevantne PNEC (SKVO) vrijednosti bez uzimanja u obzir fizikalno-kemijskih parametara vode.

Postojeći podaci u velikoj mjeri poklapaju se s našim istraživanjima obavljenima u okviru ove studije. Naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su alge najosjetljiviji organizmi na akutnu izloženost Cr(VI) spojevima. Najniža dobivena EC50 vrijednost za jednostanične zelene alge vrste *Scenedesmus subspicatus* iznosi 39.9 µg/L. Potom slijedi slatkovodni planktonski račić *Daphnia magna* (LC50 258 µg/L), dok su najmanju osjetljivost pokazali embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 270.7 µg/L.

U skladu s ovim podacima, PNEC vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost Cr(VI) vrstama temeljimo na najnižoj izmjerenoj EC50 vrijednosti od 39.9 µg/L. Osim toga, s obzirom na raspoloživost brojnih podataka o dugotrajnoj izloženosti Cr(VI) za različite taksonomske kategorije vodenih organizama, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne EC50 vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost. U tom slučaju, određena PNEC vrijednost trebala bi spriječiti bilo koje značajnije toksične učinke u slučaju akutne izloženosti i pojave kratkotrajnih visokih koncentracija Cr(VI) u vodenom okolišu.

Naši podaci također ukazuju na alge i slatkovodne račiće kao najosjetljivije organizme na akutnu izloženost Cr(III) spojevima. U skladu s ovim podacima, PNEC vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost Cr(III) vrstama temeljimo na najnižoj izmjerenoj EC50 vrijednosti od 151 µg/L za algu vrste *S. subspicatus*. S obzirom na raspoloživost brojnih podataka o

dugotrajnoj izloženosti Cr(III) za različite taksonomske kategorije vodenih organizama, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana i u slučaju Cr(III).

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) izloženosti Cr(VI), odnosno Cr(III) spojevima. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti oslonili smo se na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost za slatkovodne organizme. Nadalje, kako se slatke i slane vode značajno razlikuju u pogledu različitih abiotičkih fizikalno-kemijskih pokazatelja, uključujući pri tome i prirodne, pozadinske koncentracije esencijalnih i drugih elemenata, preporuka je da se za metale i metaloide ne kombiniraju podaci o toksičnim učincima za slatkovodne i morske organizme. Stoga, kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti i u ovom slučaju uzeli smo raspoloživu podatke iz znanstvene literature, kao i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama kromu i/ili njegovim spojevima. Nažalost, minimalno vjerodostojan niz istraživanja akutne i kronične izloženosti morskih organizama Cr(III) spojevima nije dostupan. Na raspolaganju su samo rezultati testova akutne toksičnosti za neke vrste školjkaša i kolutičavaca, ali ukupno su ovi podaci nedostatni za vjerodostojno izvođenje PNEC vrijednosti. S obzirom na opisane nedostatke, kao i u slučaju istraživanja kronične i akutne izloženosti Cr(III) spojevima u slatkovodnom okolišu, koji ukazuju na dobru korelaciju s malobrojnim studijama provedenima na morskim organizmima, PNEC vrijednosti izvedene za Cr(III) u slatkim vodama mogu u nedostatku kvalitetnijih podataka biti indikativne za morske vode.

Cjeloviti pregled preporučenih SKVO vrijednosti za krom i njegove spojeve donosimo u Tablici 25.

**Tablica 25.** Sažetak preporučenih SKVO vrijednosti za krom i njegove spojeve.

Vodeni medij	Predložena PNEC (SKVO) vrijednost (µg/L)			
	akutna (kratkotrajna) izloženost		kronična (dugotrajna) izloženost	
	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)
Slatke vode	4	15	4.5	4.7
Morske vode	32	-	0.6	-

U pogledu metodoloških zahtjeva vezanih uz analizu i monitoring kroma i njegovih spojeva, te s obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije kroma u morskoj vodi 0.5 µg/L, odnosno da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti raspoloživih standardnih metoda su na razini ispod 10 ng/L, zaključujemo da su standardne metode koje su danas na raspolaganju u potpunosti odgovarajuće za primjenu preporučenih SKVO vrijednosti.

Zaključno, potrebno je imati u vidu i slijedeće preporuke za primjenu preporučениh PNEC/SKVO vrijednosti:

1. Predložene PNEC vrijednosti za slatkovodne sustave za kronično izlaganje Cr(VI) vrstama dostatne su za usvajanje SKVO. Međutim, rizik od Cr(VI) je veći u odnosu na Cr(III) i treba biti prioritet u primjeni;
2. Rizik od izlaganja i posljedičnog toksičnog učinka Cr(III) spojeva je mali, tako da primjena PNEC/SKVO vrijednosti za Cr(III) može biti samo iznimno korištena;
3. S obzirom na niske pozadinske razine Cr(III), primjena pristupa dodanog rizika može biti preporučena, ali samo uz vjerodostojne podatke o značajnim pozadinskim koncentracijama Cr(III).

#### 4.1. Rezultati

##### 4.1.1. Identitet

U Tablici 26. navedeno je kemijsko ime i CAS (*Chemical Abstract Service*) broj tvari koja je testirana, odnosno za koju su predloženi odgovarajuće SKVO vrijednosti temeljem ovog Izvještaja.

**Tablica 26.** Tvar na koju se odnosi predmetni Izvještaj u ovom poglavlju je krom (Cr), testiran u trovalentnom ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) i šesterovalentnom ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) stanju.

Ime (kemijska oznaka)	CAS broj
Krom (Cr)	7440-47-3
Krom kalij sulfat ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	7788-99-0
Kalij bikromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )	7778-50-9

##### 4.1.2. PNEC vrijednosti kao temelj za izvođenje SKVO za krom

Kao i u slučaju arsena, bakra i cinka, temelj za izvođenje SKVO vrijednosti za krom i njegove spojeve u ovom Izvještaju su PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) vrijednosti dobivene korištenjem tri testa akutne toksičnosti, kao što je opisano u poglavlju 3. Međutim, za razliku od drugih primjera obrađenih u ovom Izvještaju, kako su predominantni Cr(VI) spojevi u okolišu gotovo u cijelosti antropogenog porijekla, odnosno prirodne pozadinske koncentracije kroma su zanemarive, pri izvođenju PNEC, odnosno SKVO vrijednosti, primjenjuje se u skladu s preporukom danom u relevantnom izvještaju EU za krom i njegove spojeve (EU Risk Assessment Report; 38) tzv. primjer „totalnog“ rizika (*total risk approach*), za razliku od pristupa „dodanog“ rizik (*added risk approach*).

Nadalje, raspoložive dugoročne studije sa slatkovodnim beskraljčnjacima ne pokazuju nikakvu jasnu ovisnost toksičnosti Cr(VI) o svojstvima vode. Iako su odnosi između tvrdoće vode i toksičnost opisani za dvovalentne metalne katione, s obzirom da su predmetne vrste Cr bitne za ovaj Izvještaj oksoanioni, njihova toksičnost može biti vrlo malo povezana s temeljnim karakteristikama vode. Detaljni odnosi između ponašanja kroma i faktora okoliša nisu do sada

razrađeni i nema podataka koji bi ukazivali na potrebu normiranja (eko)toksičnosti kroma u odnosu na temeljne fizikalno-kemijske parametre vode, osim korekcije s obzirom na karbonatnu tvrdoću (38, 39).

#### 4.1.3. Klasifikacija opasnosti

U Tablici 27. dani su podaci i međunarodno prihvaćene klasifikacijske oznake rizika za krom.

**Tablica 27.** Klasifikacija rizika za krom.

CAS broj	Kemijsko ime	R-oznake i označavanje	Literatura
7440-47-3	Krom (Cr), metal	Nije klasificirano u Aneksu I EU direktive 67/548/EEC	39
1333-82-0	Krom trioksid	O; R9–Carc. Cat. 1; R45–Muta. Cat. 2; R46–Repr. Cat. 3; R62–T+; R26–T; R24/25-48/23–C; R35–R42/43–N; R50-53	
7775-11-3	Kalij kromat	Carc. Cat. 2; R45–Muta. Cat. 2; R46–Repr. Cat.2; R60-61–T+; R26–T; R25-48/23–Xn; R21–C; R34–R42/43–N; R50-53	
10588-01-9	Kalij bikromat	O; R8–Carc. Cat. 2; R45–Muta. Cat. 2; R46–Repr. Cat. 2; R60-61–T+; R26–T; R25-48/23–Xn; R21–C; R34–R42/43–N; 50-53	

#### 4.1.4. Fizikalna i kemijska svojstva

U Tablici 28. navedena su ključna fizikalno-kemijska svojstva kroma.

**Tablica 28.** Fizikalno-kemijska svojstva kroma.

Svojstvo	Vrijednost	Literatura
Molekularna (kemijska) oznaka	Cr	
Temp. tališta (°C)	1,903 ± 10	11
Temp. vrelišta (°C)	2,642	11
Tlak para	Metal je nehlapiva krutina pri sobnoj temperaturi	
Topivost u vodi	netopiv (kao metal)	11
Relativna molekulska masa	51.996	11
Particijski koeficijent tlo-voda (log Kp)	1.91 x 10 <sup>5</sup> L kg <sup>-1</sup>	40

#### 4.1.5. Prisustvo i sudbina kroma u okolišu

Podaci o pojavnosti, abiotičkoj sudbini i specijaciji kroma u okolišu iznimno su brojni i u narednim odlomcima donosimo sažeti pregled podataka važnih za ovaj Izvještaj:

Abiotička sudbina – procesi koji kontroliraju okolišnu kemiju kroma uključuju: oblik kojim ulazi u okoliš; redoks transformaciju; procese taloženja/otapanja; te reakcije adsorpcije/desorpcije (41). U konačnici će najveći dio kroma koji je prisutan u vodi biti deponiran u sedimentima. U vodenoj fazi krom dolazi ili u topljivom stanju ili adsorbiran na suspendirane čestice (42). Otopljeni Cr(VI) može se relativno dugo zadržati u nekim vodenim tijelima, ali će na kraju biti reduciran na Cr(III) organskom tvari ili drugim redukcijskim tvarima koje su prisutne u vodi. Vrijeme zadržavanja ukupnog kroma u jezerskoj vodi kreće se od 4.6 do 18 godina (43). Kinetika oksidacije Cr(III) u Cr(VI) je spora, i pod određenim uvjetima nije značajna u prirodnim vodama (41). Spojevi kroma ne isparavaju iz vode;

Specijacija u okolišu – krom je prisutan u svakom od oksidacijskih stanja, od -2 do +6, ali je u prirodi prisutan samo u elementarnom stanju (0), te u oksidacijskim stanjima +2, +3 i +6. Cr(II) je nestabilan u većini spojeva, jer se vrlo lako oksidira kisikom u zraku u trovalentni oblik (41, 42). Termodinamički stabilan oblik kroma u vodi je Cr(VI). Međutim, sporost postizanja ravnotežnog stanja, kao i utjecaj drugih prisutnih tvari i bioloških procesa može voditi do prisustva značajnih koncentracija reduciranog Cr(III) u većini prirodnih voda (44). Tri su ključna faktora koji određuju koncentraciju Cr(III) u vodi: oksidacija otopljene organske tvari koja vodi do redukcije Cr(VI) u Cr(III); mikrobna redukcija Cr(VI); te stabilizacija reduciranih vrsta kroma organskim ligandima prisutnim u većini prirodnih voda (45, 46).

Fotosjetljivost – potencijalno značajna samo za krom povezan s organskim ligandima (45);

Distribucija u sustavima voda/sediment – većina kroma otpuštenog u vodene sustave na kraju će biti deponirana u sedimentima, s vrlo malim dijelom prisutnim u vodenoj fazi, kako u otopljenom tako i u neotopljenom obliku. Većina topivog kroma prisutna je kao Cr(VI) ili kao topivi Cr(III) kompleksi (41, 42). Adsorpcija Cr(III) i Cr(VI) je proces uvjetovan složenim redoks reakcijama. Cr(VI) je termodinamički stabilna vrsta u jako oksidirajućim uvjetima, dok Cr(III) prevladava u reducirajućim uvjetima (41). Adsorpcija Cr(III) na čestice suspendirane tvari i sediment povećava se s povećanjem pH, u suprotnosti s ponašanjem Cr(III) vrsta čija se adsorpcija smanjuje s povećanjem pH (41, 42).

Biološka transformacija – faktori koji utječu na mikrobnu redukciju Cr(VI) u Cr(III) uključuju koncentraciju biomase, početnu koncentraciju Cr(VI), temperaturu, pH, izvor ugljika, redoks potencijal te prisustvo oksianiona i metalnih kationa. Iako su visoke razine Cr(VI) toksične za većinu mikroorganizama, identificirano je i nekoliko rezistentnih sojeva bakterija (42).

Particijski koeficijenti – particijski koeficijent sediment-voda ( $K_p$ ) iznosi  $1.91 \times 10^5 \text{ L kg}^{-1}$  (40);

Bioakumulacija i biokoncentracija – iako se generalno ne očekuje biomagnifikacija kroma u hranidbenim lancima vodenih ekosistema, u brojnim studijama određeni su vrlo različiti biokoncentracijski faktori (BCF) za Cr(III) i/ili Cr(VI) i/ili ukupni Cr. Određivani BCF kretali su se od vrijednosti 1.0 za Cr(VI) u ribe vrste *Oncorhynchus mykiss*, preko raspona 125-236 za morske školjkaše i mnogočetinaše, dok su za Cr(III) spojeve bili u rasponu od 86-153 za slatkovodne, odnosno morske školjkaše. BCF određeni za ukupni Cr kretali su se u rasponu od 86 u algama bentosa do čak više od 2000 za fitoplanktonske vrste (41, 47, 48, 49).

Koncentracija kroma u vodenom okolišu – koncentracije kroma zabilježene u rijekama i slatkovodnim sustavima kreću se između 1 i 10 µg/L. U oceanima i morima koncentracije se tipično kreću između 0.5 i 1 µg/L, a najčešće su manje od 1 µg/L. Pri tome je prirodni krom gotovo uvijek prisutan u trovalentnom stanju (50).

Gotovo sav šesterovalentni krom u okolišu potječe od antropogenih aktivnosti. Uglavnom se radi o oksidaciji kroma u procesu industrijskog rudarenja prirodnih depozita kroma, te o sagorijevanju fosilnih goriva, drveta, papira i sl. U ovom oksidacijskom stanju krom je relativno stabilan u zraku i čistoj vodi, iako brojna istraživanja ukazuju da se Cr(VI) može reducirati do Cr(III) u anaerobnim uvjetima posredstvom biotičkih i abiotičkih procesa. Ovi procesi uključuju redukciju sa željezom (II), sulfidima, organskom tvari i mikroorganizmima. Redukcija je općenito intenzivnija s povećanjem koncentracije reducensa i nižim pH. Prema tome, može se očekivati da će se najbrža redukcija Cr(VI) odvijati u kiselim tlima s visokim sadržajem željeza, sulfida ili ugljika. U takvim uvjetima kompletna redukcija Cr(VI) u Cr(III) može završiti u nekoliko sati.

U anaerobnim uvjetima i pri višem pH (7.8 i iznad), Cr(VI) je čini se stabilniji prema reduciranju nego pri nižem pH, i u takvim uvjetima u površinskim vodama Cr(VI) je relativno stabilan. Slično tome, Cr(VI) je stabilan i u aerobnim sedimentima i tlima, iako je pri tome relativno mobilan. Posljedično, Cr(VI) može migrirati u anaerobne slojeve, gdje se može dogoditi redukcija u Cr(III). Prema tome, pri aerobnim uvjetima brzina redukcije Cr(VI) u Cr(III) može biti ograničena brzinom transporta iona kroma u okoliš pogodan za redukcijske reakcije. Pri obrnutim uvjetima (primjerice alkalni pH viši od 8) i/ili neutralnom pH), u kojima je prisutna niska koncentracija reducensa za Cr(VI), brzina redukcije Cr(VI) u Cr(III) bit će niska, s vremenom poluživota oko 1 god. Takvi uvjeti mogu se naći u slanoj vodi gdje je pH tipično oko 8.

U konačnici, postoji globalni okolišni ciklus kruženja kroma iz stijena i tala u vodu, biotu, zrak i natrag u tlo. Međutim, značajna količina kroma (procjena oko  $6.7 \times 10^6$  kg/god.) preusmjerava se ispuštanjem u potoke te oborinama i daljnjim otjecanjem u more, a krajnji repozitorij je oceanski sediment (50).

#### 4.1.6. Dostupni podaci o (eko)toksičnosti kroma

Podaci o (eko)toksičnosti kroma su brojni i relativno dobro sistematizirani unutar nekoliko dostupnih baza (osobito EPA ECOTOX baza podataka, <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> te TOXNET baza, <https://toxnet.nlm.nih.gov/>) i izvještaja relevantnih međunarodnih i/ili nacionalnih organizacija. Najpotpuniji podaci mogu se naći u javno dostupnim publikacijama, a pri tome su za svrhu ovog izvješća najvažniji slijedeći izvori:

- EU Risk Assessment Report: chromium trioxide, sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate, 2005 (58)
- World Health Organization (WHO) Environmental Health Criteria 61: Chromium, 1988 (51);
- US EPA Ambient Water Quality Criteria for Chromium, 1979 (52);
- US EPA Integrated Risk Information System (IRIS) (53);
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008, Toxicological Profile for Chromium (56).

Navedeni izvori upotpunjeni su pretraživanjem najnovije znanstvene literature (putem Web of Science i Scopus baza podataka) i preglednih znanstvenih publikacija vezanih uz ekotoksičnost kroma i njegovih spojeva (42, 54, 55, 56).

Najkompletniji pregled dosadašnjih istraživanja o ekotoksičnosti kroma i njegovih spojeva, uz preglednu evaluaciju studija načinjenih do 2007. god., dostupan je u relevantnom izvješću UK Environment Agency (57). Studije i istraživanja koje su publicirane u međuvremenu nisu rezultirale nekim značajno novim saznanjima, stoga za detaljniji pregled upućujemo posebno na tu publikaciju. Za svrhu ovog Izvješća ukratko ćemo navesti najvažnija saznanja o toksičnosti kroma, odnosno njegovih spojeva, za slatkovodne i morske organizme.

Toksičnost za slatkovodne organizme – vrlo opsežni podaci o dugotrajnoj (kroničnoj) i kratkotrajnoj (akutnoj) toksičnosti dostupni su za različite taksonomske skupine (alge, rakove, slatkovodne i morske ribe, vodozemce, biljke), životne stadije (juvenilni stadiji, odrasle jedinke, ličinke, jaja i sl.), toksikološke krajnje točke mjerenja (LC50, EC50, NOEC, LOEC) i uvjete pokusa. S obzirom na stabilnost, biološku raspoloživost i pretežito antropogeno porijeklo većina dostupnih podataka odnosi se na toksičnost Cr(VI) spojeva.

Alge, planktonski račići i ribe su najosjetljiviji organizmi u odnosu na kroničnu izloženosti, a alge i račići također su najosjetljiviji na akutno izlaganje kromu, odnosno njegovim spojevima, a u osjetljive skupine spadaju i vodozemci i kukci (57).

Toksičnost za morske organizme – dostupni su podaci o kroničnim i akutnim toksičnim učincima na alge, rakove, ribe, školjkaše, mnogočetinaše, kolutićavce i bodljikaše. Školjkaši, mnogočetinaši i rakovi su najosjetljiviji organizmi na kroničnu izloženost kromu, dok su alge i bodljikaši najosjetljiviji na akutnu izloženost kromu (57). Vrlo je malo vjerodostojnih ekotoksikoloških podataka za morske organizme izložene Cr(III) spojevima.

#### 4.1.7. Mehanizam toksičnosti kroma i njegovih spojeva

S obzirom na (ne)topljivost elementarnog Cr i Cr(III) spojeva, te ograničen unos Cr(III) u stanice, oni se ne smatraju posebnim (eko)toksičnim rizikom, dok su karcinogena svojstva Cr(VI) dugo poznata. Iako su neka *in vitro* istraživanja pokazala da visoke koncentracije Cr(III) spojeva u stanicima mogu dovesti do oštećenja DNA, smatra se da umjereni unos Cr(III) ne predstavlja genotoksični rizik (59).

Za razliku od Cr(III), akutna toksičnost Cr(VI) uzrokovana je njegovim snažnim oksidacijskim svojstvima, a kod sisavaca je ustanovljena u rasponu od 50 do 150 µg/kg. Nakon ulaska u optjecajni sustav Cr(VI) oksidacijskim reakcijama izravno oštećuje tkiva i stanice (60).

Tri su ključna mehanizma genotoksičnosti/karcinogenosti kroma: (1) stvaranje reaktivnih hidroksil radikala kao proizvoda redukcije Cr(VI) u Cr(III); (2) izravno vezanje Cr(VI) kao rezultata redukcijskih reakcija, i Cr(IV) spojeva na DNA; te (3) izravno vezanje na DNA krajnjih proizvoda redukcije Cr(III) spojeva (61).

Nadalje, ustanovljeno je da pojedine soli kroma (kromati) uzrokuju alergijske reakcije u sisavaca (62), dok je malo toga poznato s obzirom na utjecaj na imunološki sustav vodenih organizama.

Do sada nema podataka koji ukazuju na ksenoestrogeno djelovanje kroma ili njegovih spojeva.

## 4.2. Izvođenje SKVO za krom i njegove spojeve

Za ovo istraživanje je osobito relevantan EU RAR izvještaj (58) koji ukazuje da je akutna toksičnost za vodeni okoliš najvažnijih Cr(VI) vrsta/spojeva ovisna o brojnim faktorima, uključujući pH, tvrdoću vode, salinitet i temperaturu. Općenito, toksičnost Cr(VI) povećava se smanjenjem pH (npr. 8.0 do 6.0), povišenjem temperature (npr. 15 - 25°C), smanjenjem karbonatne tvrdoće vode (>100 do <100), te smanjenjem saliniteta (<2%). Međutim, studije kronične (dugotrajne) toksičnosti sa slatkovodnim beskralješnjacima do sada nisu jasno pokazale ovisnost toksičnosti Cr(VI) o fizikalno-kemijskim svojstvima vode. Postoje indikacije da toksičnost može biti veća u vodi manje karbonatne tvrdoće, ali nažalost nema dovoljnog broja istraživanja koja bi uspoređivala toksičnost za istu vrstu pri različitim stupnjevima tvrdoće. Prema tome, iako je odnos između tvrdoće vode i toksičnosti dvovalentnih kationa dugo poznat i relativno dobro opisan fenomen, činjenica da se u slučaju spojeva kroma u vodi radi o oksoanionima ukazuje da je njihova toksičnost vrlo malo ovisna o fizikalno-kemijskim svojstvima vode (58).

Stoga, s obzirom da detaljni odnosi između toksičnih svojstava kroma i njegovih spojeva i okolišnih faktora nisu obrađeni u relevantnom EU RAR Izvještaju i drugim dostupnim izvorima, te da dostupni podaci ne omogućavaju i/ili opravdavaju normalizaciju akutne toksičnosti Cr(VI) prema tvrdoći vode ili pH vrijednostima (primjenom primjerice višestruke regresijske analize), moguće je jedino izvoditi relevantne PNEC (SKVO) vrijednosti bez uzimanja u obzir fizikalno-kemijskih parametara vode (38).

## 4.3. Izračun PNEC vrijednosti kao temelja za izvođenje SKVO za krom

### 4.3.1. Pozadinske (okolišne) koncentracije kroma u Hrvatskoj

Podaci o koncentraciji kroma u površinskim slatkim vodama u RH malobrojni su i relativno kontradiktorni. Primjerice, dostupna su mjerenja koncentracije kroma na 4 lokacije (2014.) na rijeci Savi (Zagreb, Jasenice, Slavonski Brod, Županja) (106). Mjerenja pokazuju da se koncentracije kroma kreću u rasponu od 1.60-3.07 µg/L (Zagreb), 0.570-1.29 µg/L (Jasenice), 5.35-6.69 µg/L (Slavonski Brod) te 11.9-12.2 µg/L (Županja). Iz ovih rezultata vidljivo je da je koncentracija kroma povećava na području istočne Slavonije (106). Istovremeno, rezultati kemijskog monitoringa provedenog 2008. godine na 3 lokacije na području RH: Veličanka (Istočna Slavonija), Bukovska Dobra (Gorski kotar) i Sutla-Lupinjak (sjeverni dio RH) pokazuju da uzorci vode na svim uzorkovanim područjima spadaju u I. kategoriju, što znači da su izmjerene koncentracije kroma manje od 1 µg/L (90).

### 4.3.2. PNEC za slatkovodne sustave – akutno (kratkotrajno) izlaganje

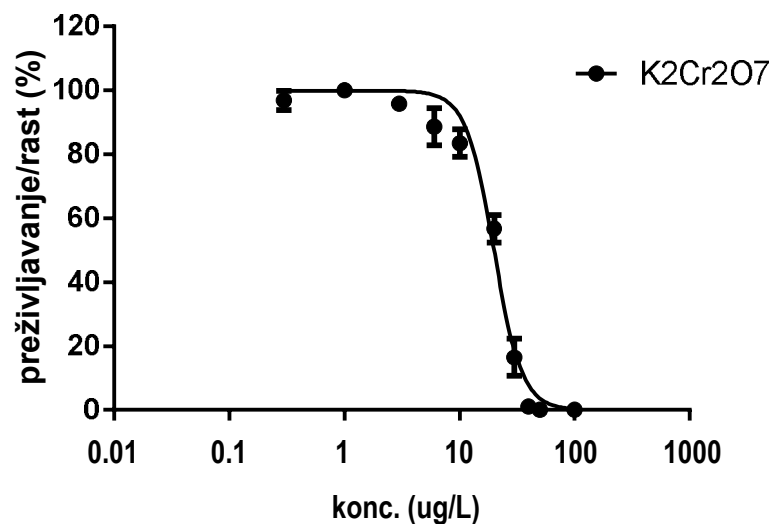
#### Cr(VI)

Dostupni su brojni podaci za različite taksonomske skupine slatkovodnih organizama (alge, rakove, biljke, kolutićavce, vodozemce, ribe) (38). Najniže prijavljene EC50 vrijednosti za Cr(VI), ispod 1 µg/L (96 h test), odnose se na testove provedene na slatkovodnim algama, iako je vjerodostojnost navedenih istraživanja ocijenjena nedovoljnom (38). Najpotpuniji podaci ukazuju da su slatkovodni račići najosjetljivije skupine beskralješnjaka u odnosu na akutnu izloženost Cr(VI) spojevima, s najnižim zabilježenim EC50 vrijednostima od 20 µg/L za vrstu *Moina australiensis* (48 h), 30 µg/L za vrstu *Ceriodaphnia sp.* (48 h), odnosno 46 µg/L za vrstu



*Daphnia magna* (48 h). Neki drugi beskralješnjaci poput mekušaca (*Anodonta imbecillis*, 96 h test, LC50 39 µg/L), oblića (*Caenorhabditis elegans*, 96 h, LC50 60 µg/L) i kolutićavaca (*Tubifex tubifex*, 48 h, LC50 63 µg/L) su također pokazali značajnu osjetljivost na Cr(VI) (38).

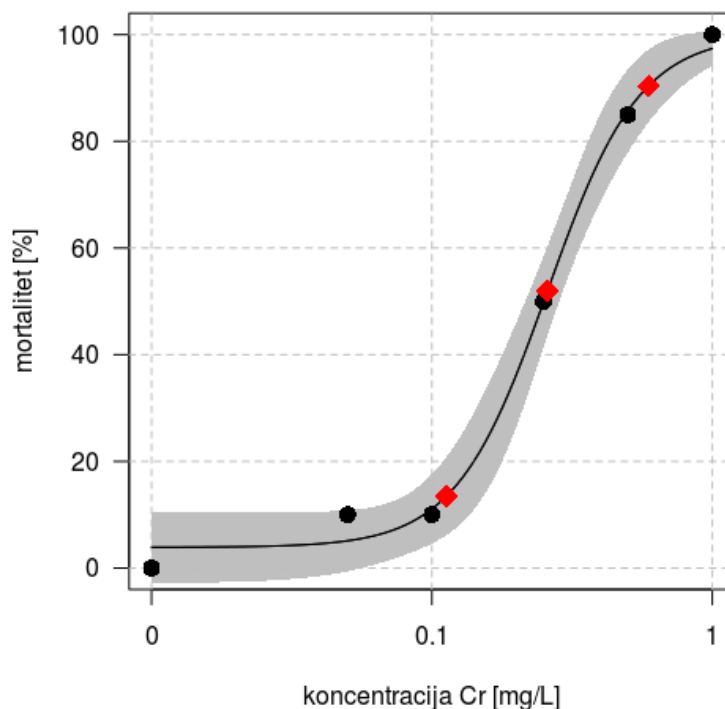
Postojeći podaci u velikoj mjeri poklapaju se s našim istraživanjima obavljenima u okviru ove studije. Štoviše, s obzirom na relativno nepotpune i/ili nevjerodostojne do sada objavljivane podatke o algama kao najosjetljivijim organizmima, naši podaci dobiveni temeljem provedenih akutnih testova toksičnosti na tri različite razine vodenih organizama (alge, rakovi, embriji riba), korištenjem međunarodno standardiziranih protokola, ukazuju da su alge uistinu najosjetljiviji organizmi na akutnu izloženost Cr(VI) spojevima. Kao što se može uočiti na slikama 16. – 18. te tablicama 29. – 31., najniža dobivena EC50 vrijednost za jednostanične zelene alge vrste *Scenedesmus subspicatus* iznosi 39.9 µg/L. Potom slijedi slatkovodni planktonski račić *Daphnia magna*. (LC50 151 µg/L), dok su najmanju osjetljivost na arsen pokazali embriji ribe zebrice (*Danio rerio*) s određenom LC50 vrijednosti od 270.7 µg/L.



**Slika 16.** Određivanje akutne toksičnosti Cr(VI) (testirana tvar  $K_2Cr_2O_7$ ) AlgalTox testom mjerenjem preživljavanja, odnosno inhibicije rasta jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5). Preživljavanje, odnosno rast algi u prisustvu različitih koncentracija  $K_2Cr_2O_7$  određeno je nakon 96 h izlaganja i izraženo u % ( $\pm$  SD rezultata mjerenja uzoraka u triplicatu; SD nije prikazana u slučaju kada je  $< 5\%$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu algi izlaganu bez dodatka kroma (preživljavanje/rast 100%). Prikazan je tipičan rezultat pokusa izvedenog u 4 nezavisna ponavljanja.

**Tablica 29.** EC<sub>50</sub> vrijednost K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (koncentracija testne tvari koja uzrokuje 50% smanjenje preživljavanja/rasta algi u odnosu na kontrolnu skupinu izlaganu bez dodatka testne tvari) za algu vrste *Scenedesmus subspicatus*, s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti. Vrijednosti prikazane u tablici kalkulirane su na temelju rezultata 4 nezavisna pokusa.

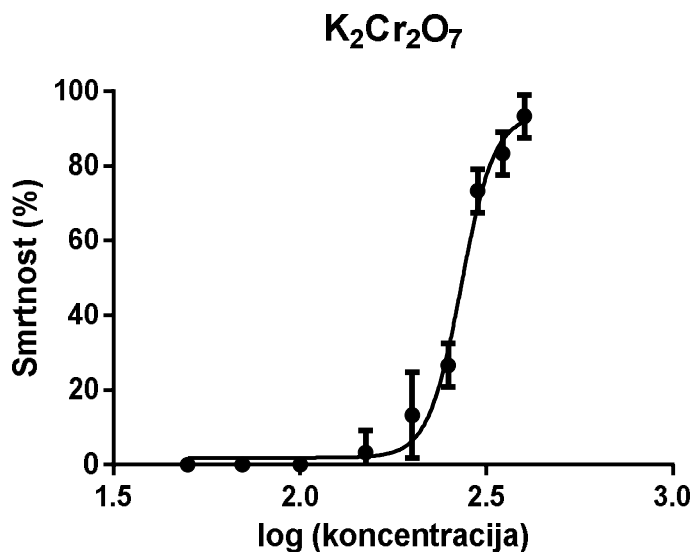
Parametar	Koncentracija [ $\mu\text{g/L}$ ]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]	95% interval pouzdanosti (gornja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]
EC <sub>50</sub>	39.9	0.72	38.24	42.18



**Slika 17.** – Mortalitet (48 h) *Daphnia magna* pri različitim koncentracijama Cr(VI) (testirana tvar: K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Sivo područje oko doza-odgovor krivulje pokazuje 95% interval pouzdanosti. Crvenim točkama označene su procijenjene LC<sub>10</sub>(48 h), LC<sub>50</sub>(48 h) i LC<sub>90</sub>(48 h) vrijednosti.

**Tablica 30.** – Procijenjene letalne koncentracije Cr(VI) za 10%, 50% i 90% populacije *Daphnia magna* - LC<sub>10</sub>(48 h), LC<sub>50</sub>(48 h) i LC<sub>90</sub>(48 h) s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti procijenjenih parametara.

Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
LC <sub>10</sub>	0.113	0.022	0.068	0.157
LC <sub>50</sub>	0.258	0.019	0.219	0.298
LC <sub>90</sub>	0.593	0.082	0.421	0.764



**Slika 18.** - Prikaz toksičnosti na zebricama (*Danio rerio*) u ovisnosti o koncentraciji Cr(VI) (testirana tvar: K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Mortalitet označava postotak umrlih embrija 96 hpf.

**Tablica 31.** Procijenjena LC<sub>50</sub> koncentracija Cr(VI) za zebriće (*Danio rerio*) s pripadajućim vrijednostima 95% intervala pouzdanosti.

Parametar	Koncentracija [µg/L]	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [µg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [µg/L]
LC <sub>50</sub>	270.7	260.00	281.9

U skladu s ovim podacima, PNEC vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost Cr(VI) vrstama temeljimo na najnižoj izmjerenoj EC<sub>50</sub> vrijednosti od 39.9 µg/L (Tablica 29.), kao što je preporučeno u smjernicama u TGD dokumentu EU (4). Osim toga, s obzirom na raspoloživost brojnih podataka o dugotrajnoj izloženosti Cr(VI) za različite taksonomske kategorije vodenih organizama, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana za ekstrapolaciju od akutne EC<sub>50</sub> vrijednosti do PNEC vrijednosti za akutno (kratkotrajno) izlaganje koje je temelj za definiranje SKVO vrijednosti za akutnu izloženost. U tom slučaju, određena PNEC vrijednost trebala bi spriječiti bilo koje značajnije toksične učinke u slučaju akutne izloženosti i pojave kratkotrajnih visokih koncentracija Cr(VI) u vodenom okolišu.

Zaključno:

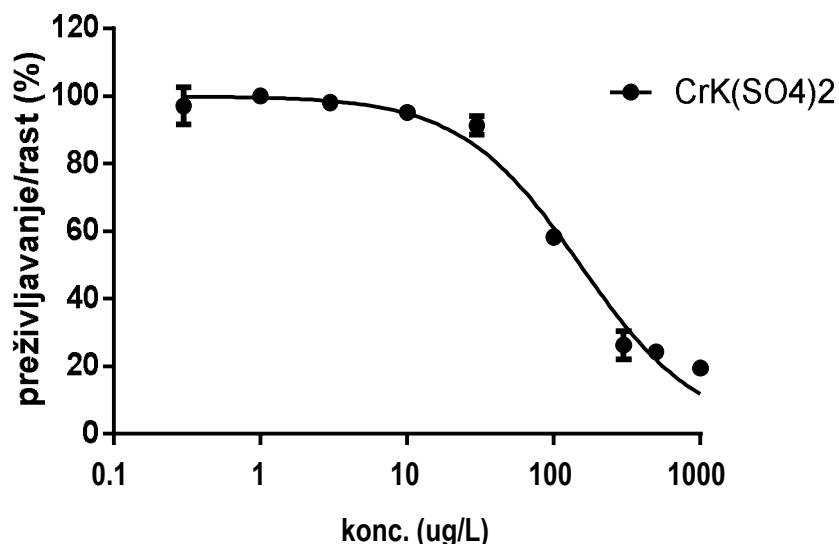
**PNEC, slatkovodni-akutna izloženost = 39.9 µg/L / AF (10) = 4 µg/L otopljenog Cr(VI)**

### Cr(III)

Temeljem raspoloživih podataka o toksičnosti Cr(III) alge se čine kao najosjetljiviji organizmi, s najnižom objavljenom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 320 µg/L za vrstu *Selenastrum capricornutum* (96

h). Među beskralješnjacima su najniže zabilježene LC50 vrijednosti u rasponu od 1-15 mg/L (rakovi, kukci, mekušci i kolutićavci), dok je najniža LC50 vrijednost za ribe na razini 3.33 mg/L (38).

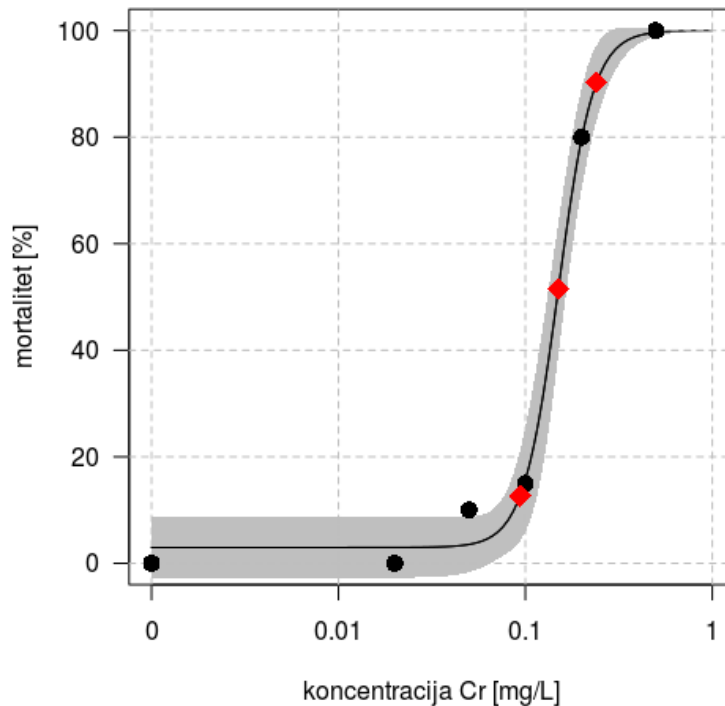
Naši podaci također ukazuju na alge i slatkovodne račice kao najosjetljivije organizme na akutnu izloženost Cr(III) spojevima (slike 19. – 22., tablice 32. – 34.).



**Slika 19.** Određivanje akutne toksičnosti Cr(III) (testirana tvar  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ ) AlgalTox testom mjerenjem preživljavanja, odnosno inhibicije rasta jednostaničnih zelenih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* (5). Preživljavanje, odnosno rast algi u prisustvu različitih koncentracija  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  određeno je nakon 96 h izlaganja i izraženo u % ( $\pm$  SD rezultata mjerenja uzoraka u triplikatu; SD nije prikazana u slučaju kada je < 5%) u odnosu na kontrolnu skupinu algi izlaganu bez dodatka kroma (preživljavanje/rast 100%). Prikazan je tipičan rezultat pokusa izvedenog u 4 nezavisna ponavljanja.

**Tablica 32.**  $\text{EC}_{50}$  vrijednost  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  (koncentracija testne tvari koja uzrokuje 50% smanjenje preživljavanja/rasta algi u odnosu na kontrolnu skupinu izlaganu bez dodatka testne tvari) za algu vrste *Scenedesmus subspicatus*, s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti. Vrijednosti prikazane u tablici kalkulirane su na temelju rezultata 4 nezavisna pokusa.

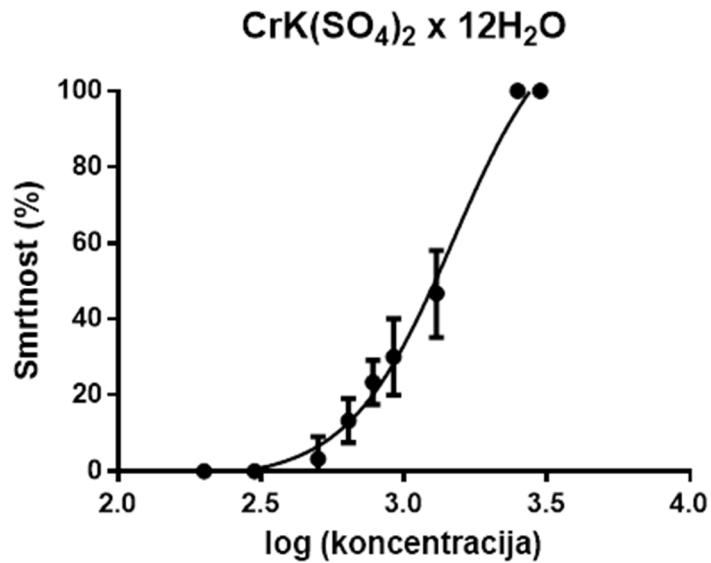
Parametar	Koncentracija [ $\mu\text{g/L}$ ]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]	95% interval pouzdanosti (gornja granica) [ $\mu\text{g/L}$ ]
$\text{EC}_{50}$	151.6	1.83	127.7	180.1



**Slika 20.** – Mortalitet (48 h) *Daphnia magna* pri različitim koncentracijama Cr(III) (testirana tvar:  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ). Sivo područje oko doza-odgovor krivulje pokazuje 95% interval pouzdanosti. Crvenim točkama označene su procijenjene  $\text{LC}_{10}(48 \text{ h})$ ,  $\text{LC}_{50}(48 \text{ h})$  i  $\text{LC}_{90}(48 \text{ h})$  vrijednosti.

**Tablica 33.** – Procijenjene letalne koncentracije kroma (Cr) za 10%, 50% i 90% populacije *Daphnia magna* -  $\text{LC}_{10}(48 \text{ h})$ ,  $\text{LC}_{50}(48 \text{ h})$  i  $\text{LC}_{90}(48 \text{ h})$  s pripadajućim vrijednostima standardne greške i 95% intervalom pouzdanosti procijenjenih parametara.

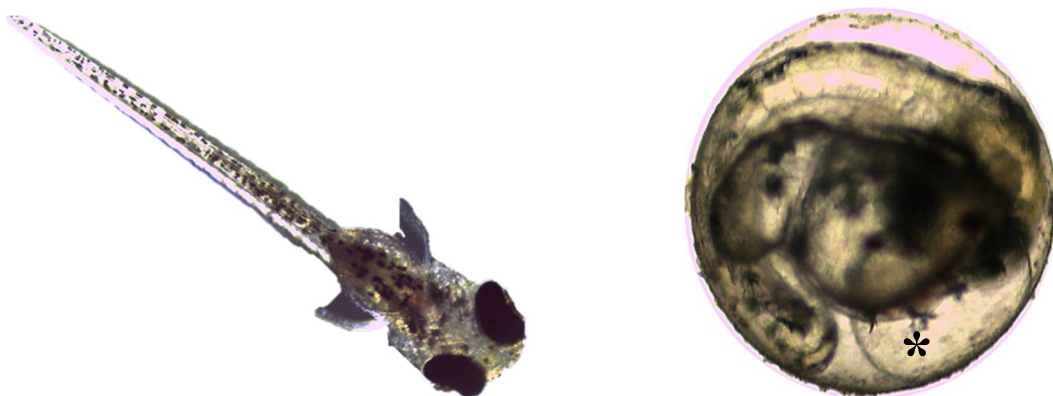
Parametar	Koncentracija [mg/L]	Standardna greška	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [mg/L]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [mg/L]
$\text{LC}_{10}$	0.094	0.011	0.070	0.117
$\text{LC}_{50}$	0.151	0.010	0.130	0.172
$\text{LC}_{90}$	0.242	0.026	0.187	0.297



**Slika 21.** - Prikaz toksičnosti na zebricama (*Danio rerio*) u ovisnosti o koncentraciji kroma (Cr) (testirana tvar:  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ). Mortalitet označava postotak umrlih embrija 96 hpf.

**Tablica 34.** Procijenjena  $\text{LC}_{50}$  koncentracija krom (Cr) za zebriće (*Danio rerio*) s pripadajućim vrijednostima 95% intervala pouzdanosti.

Parametar	Koncentracija [ $\mu\text{g}/\text{L}$ ]	95% interval pouzdanosti (donja granica, LCI) [ $\mu\text{g}/\text{L}$ ]	95% interval pouzdanosti (gornja granica, LCI) [ $\mu\text{g}/\text{L}$ ]
$\text{LC}_{50}$	1479.00	1131.00	1933.00



**Slika 22.** Prikaz razvojnih abnormalnosti nastalih nakon 96 h izlaganja embrija zebriće (*Danio rerio*) kromu (testirana tvar:  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ). a) kontrola prikazuje normalno razvijen embrij 96 hpf, b) f) embrij sa zaostatkom u razvoju i nastalim perikardijalnim edemom (zvjezdica).

U skladu s ovim podacima, PNEC vrijednost za slatkovodna sustave i akutnu izloženost Cr(III) vrstama temeljimo na najnižoj izmjerenoj EC50 vrijednosti od 151 µg/L, kao što je preporučeno u smjernicama u TGD dokumentu EU (4). Osim toga, s obzirom na raspoloživost brojnih podataka o dugotrajnoj izloženosti Cr(III) za različite taksonomske kategorije vodenih organizama, primjena umanjenog faktora sigurnosti (*assessment factor*; AF) od 10 (umjesto 100) je opravdana.

Prema tome:

**PNEC, slatkovodni-akutna izloženost = 151 µg/L / AF (10) = 15 µg/L otopljenog Cr(III)**

4.3.3. PNEC za slatkovodne sustave – kronično (dugotrajno) izlaganje

Cr(VI)

U okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti. S obzirom na tu činjenicu kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za kroničnu izloženost Cr(VI) spojevima.

U skladu s pristupom izvođenja PNEC vrijednosti primjenom faktora procjene (AF), PNEC za kroničnu izloženost temelji se na najnižoj zabilježenoj NOEC vrijednosti za dugotrajno izlaganje. U skladu s relevantnim EU RAR izvještajem (58), najniža vjerodostojno objavljena NOEC vrijednost je 4.7 µg/L za slatkovodnog račića vrste *Ceriodaphnia dubia*. S obzirom da se radi o NOEC vrijednosti, te s obzirom na raspoloživost kvalitetnih podataka o dugotrajnoj izloženosti primjena faktora procjene od 1 je opravdana u ovom slučaju.

Prema tome:

**PNEC, slatkovodni sustavi-kronična izloženost = 4.7 µg/L / (AF 1) = 4.7 µg/L otopljenog Cr(VI)**

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost Cr(VI) u slatkovodnim ekosistemima.

Cr(III)

S obzirom da u odgovarajućim uvjetima okoliša dolazi do transformacije Cr(VI) u Cr(III), mogući toksični učinci Cr(III) spojeva također trebaju biti razmotreni. Kako su podaci o toksičnim učincima Cr(III) vrsta dosljedno analizirani u odgovarajućim EU i drugim nacionalnim izvorima (38, 58), iz raspoloživih podataka može se vjerodostojno zaključiti da su Cr(III) spojevi manje toksični nego Cr(VI) u vodama srednje razine tvrdoće (>50 mg/L CaCO<sub>3</sub>). U vodama nižeg stupnja tvrdoće akutna toksičnost se povećava. Najniža vjerodostojno zabilježena LC50 vrijednost od 0.05 mg/L odnosi se na ribu vrste pastrva (*Oncorhynchus mykiss*), među beskralješnjacima je to račić vrste *Daphnia magna* (LC50 0.047 mg/L), a NOEC od >2 mg/L objavljen je za algu vrste *Chlorella pyrenoidosa*, dok je EC50 vrijednost 0.32 mg/L objavljena

za algu vrste *Selenastrum capricornutum* (38, 58). S obzirom na odgovarajuću raspoloživost kvalitetnih podataka o dugotrajnoj (akutnoj) toksičnosti upotreba faktora procjene (AF) od 10 je opravdana.

Prema tome:

$$\text{PNEC, slatkovodni sustavi-kronična izloženost} = 47 \mu\text{g/L} / (\text{AF } 10) = 4.7 \mu\text{g/L otopljenog Cr(III)}$$

Navedenu vrijednost prema našem mišljenju moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost Cr(III) u slatkovodnim ekosistemima.

#### 4.3.4. PNEC za morske vode

Kako provedba dodatnih testova akutne ili kronične toksičnosti na morskim organizmima nije bila predmet ovog Izvješća, kao podlogu za izvođenje SKVO vrijednosti potrebno se prema tome osloniti na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija koji su publicirani u svrhu definiranja SKVO vrijednosti za akutnu i kroničnu izloženost morskih organizama kromu (III i VI) i/ili njegovim spojevima.

##### PNEC za kroničnu (dugotrajnu) izloženost

##### Cr(VI)

Prema dostupnim podacima morski beskralješnjaci poput školjkaša *Mytilus edulis* (trajanje testa 12 tjedana, NOEC 4–6  $\mu\text{g/L}$ ), mnogočetinaša *Nereis arenaceodentata* (2 tjedna, NOEC 6  $\mu\text{g/L}$ ), odnosno raka vrste *Cancer anthonyi* (12 tjedana, LOEC 10  $\mu\text{g/L}$ ) najosjetljiviji su organizmi na dugotrajno izlaganje Cr(VI) vrstama (38, 58), a objavljena je i relativno nevjerodostojna NOEC vrijednost za alge (0.1  $\mu\text{g/L}$ ). Istraživanja na ribama jasno ukazuju na nižu osjetljivost u odnosu na beskralješnjake.

S obzirom da se NOEC vrijednost od 6  $\mu\text{g/L}$  dobivena za mnogočetinaša *Nereis arenaceodentata* smatra najvjerodostojnijim istraživanjem koje udovoljava traženim standardima kvalitete, navedena vrijednost uzima se prema EU RAR izvještaju (58) kao osnova za izvođenje PNEC vrijednosti.

Nadalje, s obzirom na upute dane u TGD dokumentu (4) za procjenu rizika u morskim ekosistemima, primjena faktora procjene od 10 za izvođenje PNEC vrijednosti je opravdana uzimajući u obzir raspoloživost podataka o kroničnoj izloženosti za ribe, rakove i alge te najmanje dvije dodatne taksonomske skupine morskih organizama.

Prema tome:

$$\text{PNEC, morske vode-kronična izloženost} = 6 \mu\text{g/L} / (\text{AF } 10) = 0.6 \mu\text{g/L otopljenog Cr(VI)}$$



Navedenu vrijednost prema našem moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju dugotrajna (kronična) izloženost Cr(VI) spojevima u morskom okolišu.

### Cr(III)

Nažalost, osim manjeg broja odgovarajućih istraživanja korištenjem mnogočetinaša vrste *Neanthes arenaceodentata*, rezultirajući s NOEC vrijednosti od >50 mg/L za Cr(III), te relativno brojnih studija akutne toksičnosti, nema dovoljno istraživanja kronične izloženosti Cr(III) spojevima u morskom okolišu (38, 58). Međutim, s obzirom da dostupni podaci dobiveni testovima akutne toksičnosti Cr(III) vrsta na morskim organizmima dobro koreliraju s rezultatima akutnih izlaganja modelnih slatkovodnih organizama, PNEC/SKVO vrijednosti tih studija mogu u nedostatku boljih podataka služiti kao instruktivne vrijednosti za morske vode (38).

### PNEC za akutnu (kratkotrajnu) izloženost

#### Cr(VI)

Najniže zabilježena EC50 vrijednost istraživanja koje zadovoljavaju EU RAR kriterije kvalitete zabilježena je za raka vrste *Callinectes sapidus* (96 h, LC50 0.32 mg/L) (63). Stoga se ta vrijednost može uzeti kao temelj za izračun PNEC vrijednosti za akutno izlaganje u morskim vodama. Prema tome, s obzirom na TGD dokument EU ne daje specifične instruktivne preporuke za akutne učinke izazvane povremenim ispuštima u morske vode, preporuka je PNEC vrijednosti za akutnu izloženost izvoditi temeljem općih TGD preporuka za povremena, akutna ispuštanja (4). S obzirom na činjenicu da je ta vrijednost za najosjetljiviju vrstu približno unutar raspona najnižih vrijednosti za kronično izlaganje, i u ovom slučaju odgovarajuće je primijeniti faktor procjene (AF) od 10. Iako podaci o akutnoj izloženosti za morske ribe nedostaju, raspoloživi podaci o kroničnoj izloženosti ukazuju da je vrlo malo vjerojatno da su ribe najosjetljivija taksonomska kategorija (38).

Prema tome:

$$\text{PNEC, morske vode-akutna izloženost} = 320 \mu\text{g/L} / \text{AF (10)} = 32 \mu\text{g/L otopljenog Cr(VI)}$$

Navedenu vrijednost moguće je primjenjivati kao SKVO vrijednost i u Republici Hrvatskoj kada je u pitanju kratkotrajna (akutna) izloženost Cr(VI) u morskim ekosistemima.

### Cr(III)

Nažalost, kao i za kronična izlaganja, minimalno vjerodostojan niz istraživanja akutne izloženosti morskih organizama Cr(III) spojevima nije dostupan (38, 58). Na raspolaganju su samo rezultati testova akutne toksičnosti za neke vrste školjkaša i kolutićavaca, ali ukupno su ovi podaci nedostadni za vjerodostojno izvođenje PNEC vrijednosti. S obzirom na opisane nedostatke, kao i u slučaju istraživanja kronične izloženosti Cr(III) spojevima u slatkovodnom okolišu, koji ukazuju na dobru korelaciju s malobrojnim studijama provedenima na morskim

organizmima, PNEC vrijednosti izvedene za Cr(III) i akutnu izloženost u slatkim vodama mogu biti indikativne za morske vode.

#### **4.4. Analiza i monitoring**

Standardne metode koje su danas na raspolaganju za mjerenje koncentracija kroma i njegovih tro i šesterovalentnih spojeva u slatkim i slanim vodama (38) brojne su i uključuju primjerice:

- ICP-MS (Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom);
- AAS (Atomska apsorpcijska spektroskopija);
- GC-ECD (Plinska kromatografija s detektorom zahvata elektrona).

Međutim, s obzirom da je najniža predložena PNEC (SKVO) vrijednost za određivanje koncentracije Cr(III) ili Cr(VI) spojeva u slatkoj ili morskoj vodi 0.6 µg/L, te da su zahtjevi kvalitete mjerenja takvi da pri trećini primjenjivane SKVO vrijednosti ukupna greška mjerenja ne smije premašivati 50 %, a aktualni detekcijski limiti navedenih standardnih metoda su na razini 1 ng/L, zaključujemo da su metode koje su trenutno na raspolaganju nisu bezuvjetno dostatne za primjenu preporučenih najnižih SKVO vrijednosti.

#### **4.5. Dodatne napomene**

Nekoliko relevantnih napomena za primjenu preporučenih PNEC/SKVO vrijednosti za krom i njegove spojeve:

Cr(VI)

1. Predložene PNEC vrijednosti za slatkovodne sustave za kronično izlaganje Cr(VI) vrstama dostatne su za usvajanje SKVO. Međutim, rizik od Cr(VI) je veći u odnosu na Cr(III) i treba biti prioritet u primjeni;
2. Rizik od izlaganja i posljedičnog toksičnog učinka Cr(III) spojeva je mali, tako da primjena PNEC/SKVO vrijednosti za Cr(III) može biti samo iznimno korištena;
3. S obzirom na niske pozadinske razine Cr(III), primjena pristupa dodanog rizika može biti preporučena, ali samo uz vjerodostojne podatke o značajnim pozadinskim koncentracijama Cr(III).

## 5. Završni zaključci i preporuke

Temeljem provedenih istraživanja i uvida u međunarodno raspoložive podatke u ovom izvještaju predložili smo SKVO vrijednosti za vodeni okoliš za arsen, bakar, cink i krom, odnosno njihove spojeve. Pri tome napominjemo da je za vjerodostojno razmatranje i eventualnu implementaciju predloženih SKVO vrijednosti potrebno obratiti pažnju na slijedeća zapažanja:

1. Vjerodostojno određivanje SKVO vrijednosti za metale koji imaju značajne pozadinske koncentracije u vodenom okolišu temelji se na metodi dodanog rizika (engl. *added risk approach*), odnosno raspolaganju vjerodostojnim podacima o pozadinskim koncentracijama na predmetnim područjima na kojima bi predloženi standardi trebali biti implementirani. Nažalost, traženi podaci za RH su vrlo manjkavi i nisu javno raspoloživi na jasan i sistematiziran način. Nadalje, uočene varijabilnosti u rezultatima mjerenja su vrlo vjerojatno posljedica različite metodologije i različitih standarda kvalitete mjerenja pri određivanju koncentracija metala u vodenom okolišu. Prema tome, od izuzetne je važnosti pokrenuti i održavati sistemski ujednačen model i program mjerenja koncentracije metala u slatkim i slanim vodama u RH. Jednako tako važno je takve podatke objediniti u javno raspoloživu nacionalnu bazu podataka;
2. Bez poznavanja vjerodostojno utvrđenih pozadinskih koncentracija predmetnih metala u vodenom okolišu na prosječnoj godišnjoj razini za određeno područje, bit će nužno primjenjivati strože SKVO vrijednosti izvedene za akutnu (kratkotrajnu) izloženost;
3. Kako u okviru ovog istraživanja nisu provedeni testovi kronične (dugotrajne) toksičnosti, jedini stručno vjerodostojan pristup za izvođenje SKVO vrijednosti bio je osloniti se na raspoloživu literaturu i izvještaje drugih nacionalnih organizacija. U nedostatku potpunijih istraživanja predložene SKVO vrijednosti mogu se po našem mišljenju primjenjivati kao standard za RH;
4. Zbog svojih geoloških osobitosti neka područja RH karakterizirana su vrlo visokim pozadinskim koncentracijama pojedinih metala, a osobito je pri tome karakterističan arsen. Stoga je za određivanje maksimalno dopuštenih koncentracija (MPC), koje efektivno trebaju biti zbroj pozadinskih i SKVO koncentracija, nužno imati što kvalitetnije podatke o prosječnim godišnjim koncentracijama metala;
5. Nastavno na 4., iako ovakav pristup izvođenju MPC vrijednosti treba rezultirati dostatnom zaštitom vodenih organizama prisutnih na predmetnom području, a koji su pretpostavljeno postali tolerantni na povišene pozadinske koncentracije, primjerice arsena, navedene vrijednosti nisu nužno i odgovarajuća zaštita kada je u pitanju zdravlje ljudi koji konzumiraju pitku vodu iz pojedinih vodocrpilišnih područja;
6. Iako su u ovom izvještaju za pojedine metale (arsen i krom) s obzirom na oksidacijsko stanje istraživani učinci dominantnih oblika koji se pojavljuju u vodenom okolišu (arsen

(III) i (V) spojevi, odnosno krom (III) i (VI) oblici), prioritet u primjeni trebaju imati SKVO vrijednosti određene za oblike koji su u prirodi dominantni i posljedično predstavljaju veći rizik. U slučaju istraživanih metala to su svakako arsen(V) i krom(VI) vrste.

## 6. Važnija literatura

1. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union; dostupno online: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:EN:PDF>
2. Zakon o vodama («Narodne novine», br. 153/2009, 63/2011, 130/2011, 56/2013 i 14/14). Dostupno online: <http://www.voda.hr/hr/zakoni>
3. Uredba o standardu kakvoće voda (Urednički pročišćeni tekst, "Narodne novine", broj 73/13, 151/14 i 78/15). Dostupno online: [http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_06\\_73\\_1463.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_73_1463.html)
4. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) Guidance Document No. 27 – Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Dostupno online: <https://circabc.europa.eu/sd/a/0cc3581b-5f65-4b6f-91c6-433a1e947838/TGD-EQS%20CIS-WFD%2027%20EC%202011.pdf>
5. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 – Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Dostupno online: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test\\_9789264069923-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en)
6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 – Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. Dostupno online: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test\\_9789264069947-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en)
7. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 2 – Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Dostupno online: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test\\_9789264203709-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en)
8. Preconsultation report: Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: arsenic (total dissolved) (2007). WFD UK TAG. Dostupno online: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/291226/scho0407blvu-e-e.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/291226/scho0407blvu-e-e.pdf)
9. ECHA – Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion on arsenic acid and its inorganic salts ECHA/RAC/A77-O-0000001412-86-148/F (2017). Dostupno online: [https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/opinion\\_arsenic\\_en.pdf/dd3eb795-108e-5d3a-6847-ddd021a9dc](https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/opinion_arsenic_en.pdf/dd3eb795-108e-5d3a-6847-ddd021a9dc)
10. Division of Specialized Information Services (SIS) of the US National Library of Medicine (NLM), 2005 Toxicology Data Network (TOXNET®): Hazardous Substances Data Bank (HSDB®) [online]. Bethesda, MD: SIS. Dostupno online: <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
11. Budavari S, O'Neil M J, Smith A, Heckelman P E and Kinneary J F, 1996 Editors The Merck Index: An Encyclopaedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (12<sup>th</sup> edn.) Rahway, NJ: Merck & Co., Inc.
12. TOXNET®. Dostupno online: <https://vsearch.nlm.nih.gov/vivisimo/cqi-bin/query-meta?v%3Aproject=sis&v%3Asources=sis-bundle&query=arsenic>

13. World Health Organization (WHO), 2001 Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds (2nd edn.). International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva: WHO. Dostupno online: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/>
14. Crommentuijn T, Polder M D and van de Plassche E J, 1997 Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for metals, taking background concentrations into account. RIVM Report No. 601501001. Bilthoven, the Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment (RIVM).
15. WRC, 1984. Mance G, Musselwhite C and Brown V M, Proposed Environmental Quality Standards for List II substances in water: arsenic. TR 212. Prepared for the Department of the Environment (DoE). Medmenham, Buckinghamshire.
16. Maeda S, Nakashima S, Takeshita T and Higashi S, 1985 Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae and the application to the removal of inorganic arsenic from an aqueous phase. Part II. By *Chlorella vulgaris* isolated from arsenic polluted environment. *Separation Science and Technology*, 20, 153–161.
17. Lynch T R, Popp C J and Jacobi G Z, 1988 Aquatic insects as environmental monitors of trace metal contamination: Red River, New Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*, 42, 19–31.
18. WRC, 1992. Smith I N H and Edwards V, Revised Environmental Quality Standards for arsenic in water. Final report to the Department of the Environment (DoE). Report No. DoE 2633/1. Medmenham, Buckinghamshire.
19. US Environmental Protection Agency (US EPA), 1984 Ambient water quality criteria for arsenic – 1984. Duluth, MA, and Narragansett, RI: US EPA Office of Research and Development Environmental Research Laboratories. Dostupno online: <http://www.epa.gov/ost/pc/ambientwqc/arsenic1984.pdf>
20. Spehar R L, Fiandt J T, Anderson R L and De Foe D E, 1980 Comparative toxicity of arsenic compounds and their accumulation in invertebrates and fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9, 53–63.
21. Michael F. Hughes, Barbara D. Beck, Yu Chen, Ari S. Lewis, David J. Thomas; Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective, *Toxicological Sciences*, Volume 123, Issue 2, 1 October 2011, Pages 305–332. Dostupno online: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>
22. Ventura-Lima J, Reis Bogo M, Monserrat JB (2011) Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotox Environ Safety*, 74, 211-218.
23. International Agency for Research on Cancer (IARC), 1973 Arsenic and Inorganic Arsenic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 2, 48. Lyon, France: IARC.
24. International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987 Arsenic and Arsenic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, 100. Lyon, France: IARC.
25. Struijs J, van de Meent D, Peijnenburg W J G M, van den Hoop M A G T and Crommentuijn T, 1997 Added risk approach to derive maximum permissible concentrations for heavy

- metals: how to take natural background levels into account. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, No. 2, 112–118.
26. Chen F, Chen W and Dai S, 1994 Toxicities of four arsenic species to *Scenedesmus obliquus* and influence of phosphate on inorganic arsenic toxicities. *Toxicology and Environmental Chemistry*, 41, No. 1/2, 1–7.
  27. Novak A, Walters B S and Passino D R M, 1980 Toxicity of contaminants to invertebrate food organisms. *Progress in Fish Research 1980*. Ann Arbor, MI: Great Lakes Fish Laboratory, US Fish and Wildlife Service.
  28. Blakley B, Sisodia C and Mukkur T, 1980 The effect of methylmercury, tetraethyl lead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 52, 245–254.
  29. Khangarot B S, Sehgal A and Bhasin M K, 1985 Man and biosphere – studies on the Sikkim Himalayas. Part 5: acute toxicity of selected heavy metals on tadpoles of *Rana hexadactyla*. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 13, 259–263.
  30. Ishaque A B, Tchounwou P B, Wilson B A and Washington T, 2004 Developmental arrest in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos exposed to sublethal concentrations of atrazine and arsenic trioxide. *Journal of Environmental Biology*, 25, 1–6.
  31. Damjanović M (2015) Arsen u vodama istočne Hrvatske. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
  32. Sanders J G, 1979 Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 15, 424–428.
  33. Garman G D, Anderson S L and Cherr G N, 1997 Developmental abnormalities and DNA-protein crosslinks in sea urchin embryos exposed to three metals. *Aquatic Toxicology*, 39, 247–265.
  34. Office of Pesticide Programs, 2000 Pesticide Ecotoxicity Database. [Formerly Environmental Effects Database (EEDB)]. Washington, DC: US EPA Environmental Fate and Effects Division.
  35. Forget J, Pavillon J F, Menasria M R and Bocquene G, 1998 Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40, 239–244.
  36. Krishnakumari L, Varshney P K, Gajbhiye S N, Govindan K and Nair V R, 1983 Toxicity of some metals on the fish *Therapon jarbua* (Forsskal 1775). *Indian Journal of Marine Sciences*, 12, 64–66.
  37. European Union Risk Assessment Report: CHROMIUM TRIOXIDE, SODIUM CHROMATE, SODIUM DICHROMATE, AMMONIUM DICHROMATE AND POTASSIUM DICHROMATE (2005). Raspoloživo na: <https://echa.europa.eu/documents/10162/3be377f2-cb05-455f-b620-af3cbe2d570b>
  38. UK Environment Agency. Preconsultation report: Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: chromium(VI) and chromium(III) (dissolved) (2007). Dostupno online:

[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/291229/scho0407blvq-e-e.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/291229/scho0407blvq-e-e.pdf)

39. ECHA – Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion on an Application for Authorisation for Chromium trioxide use, ECHA/RAC/SEAC: AFA-O-0000006468-64-01/D (2016). Raspoloživo na: [https://echa.europa.eu/documents/10162/18584504/compiled\\_rac\\_seac\\_opinion\\_globe\\_en.pdf/7cae156a-ca69-4da9-910a-a8daa7511554](https://echa.europa.eu/documents/10162/18584504/compiled_rac_seac_opinion_globe_en.pdf/7cae156a-ca69-4da9-910a-a8daa7511554)
40. Crommentuijn T, Polder M D and van de Plassche E J, 1997 Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for metals, taking background concentrations into account. RIVM Report No. 601501001. Bilthoven, the Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment (RIVM).
41. (TOXNET®) baza. Raspoloživo na: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2>
42. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2000 Toxicological profile for chromium. Atlanta, GA: ATSDR, US Department of Health and Human Services.
43. Schmidt J A and Andren A W, 1984 Deposition of airborne metals into the Great Lakes: an evaluation of past and present estimates. *Advances in Environmental Science and Technology*, 14, 81–103.
44. Elderfield H, 1970 Earth planet. *Science Letter*, 9, 10–16.
45. James B R and Bartlett R J, 1983 Behavior of chromium in soils. V. Fate of organically-complexed Cr (III) added to soil. *Journal of Environmental Quality*, 12, 169–172.
46. Wang Y T and Shen H, 1993 Biological reduction of hexavalent chromium with simultaneous degradation of aromatic pollutants. In *Proceedings of the 66th Annual Conference and Exposition of the Water Environment Federation (Vol. 1)*, 385–394. Alexandria, VA: Water Environment Federation.
47. US Environmental Protection Agency (US EPA), 1980 Ambient Water Quality Criteria Document Chromium – 1980. US EPA 440/5-80-035. Washington, DC: US EPA.
48. US Environmental Protection Agency (US EPA), 1985 Ambient Water Quality Criteria Document Chromium – 1984. US EPA 440/5-84-029. Washington, DC: US EPA.
49. National Academy of Sciences (NAS), 1974 *Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants: Chromium*. Washington, DC: National Academy Press.
50. European Commission, 2005 *European Union Risk Assessment Report: Chromium trioxide, sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate*. Series: 3rd Priority List, Volume 53. Final Report June 2005. EUR 21508 EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg: Office of Official Publications of the European Communities.
51. World Health Organization (WHO), 1988 *Environmental Health Criteria 61: Chromium*. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva: WHO. Dostupno online: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc61.htm>
52. US EPA Ambient Water Quality Criteria for Chromium (1979). Dostupno online: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/9100H7HL.PDF?Dockkey=9100H7HL.PDF>



53. US EPA Integrated Risk Information System (IRIS): Chromium(VI) CASRN 18540-29-9. Dostupno online: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicallanding.cfm?substance\\_nمبر=144](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicallanding.cfm?substance_nمبر=144)
54. Velma V, Vutukuru SS, Tchounwou PB. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Rev Environ Health*. 2009; 24(2):129–145.
55. Guertin J. Toxicity and health effects of chromium (all oxidation states) In: Guertin J, Jacobs JA, Avakian CP, editors. *Chromium (VI) Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. pp. 216–234.
56. Barnhart J. Chromium chemistry and implications for environmental fate and toxicity. 1997, *Journal of Soil Contamination*, Volume 6.
57. Preconsultation report: Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: chromium(VI) and chromium(III) (dissolved) (2007). WFD UK TAG. Dostupno online: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/291229/scho0407blvq-e-e.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/291229/scho0407blvq-e-e.pdf)
58. EU Risk Assessment Report: chromium trioxide, sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate. 2005. Dostupno online: <https://echa.europa.eu/documents/10162/3be377f2-cb05-455f-b620-af3cbe2d570b>
59. Eastmond, David A.; MacGregor, J. T.; Slesinski, R. S., 2008. Trivalent Chromium: Assessing the Genotoxic Risk of an Essential Trace Element and Widely Used Human and Animal Nutritional Supplement. *Critical Reviews in Toxicology*. 38 (3): 173–190. PMID 18324515. doi:10.1080/10408440701845401
60. Katz, Sidney A.; Salem, H., 1992. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: A review. *Journal of Applied Toxicology*. 13 (3): 217–224. PMID 8326093. doi:10.1002/jat.2550130314
61. Cohen, M. D.; Kargacin, B.; Klein, C. B.; Costa, M., 1993. Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 23 (3): 255–281. PMID 8260068. doi:10.3109/10408449309105012
62. Basketter, David; Horev, L.; Slodovnik, D.; Merimes, S.; Trattner, A.; Ingber, A., 2000. Investigation of the threshold for allergic reactivity to chromium. *Contact Dermatitis*. 44 (2): 70–74. PMID 11205406. doi:10.1034/j.1600-0536.2001.440202.x
63. Bookhout C G, Monroe R J, Forward R B and Costlow J D, 1984 Effects of soluble fractions of drilling fluids on development of crabs, *Rhithropanopeus harrisi* and *Callinectes sapidus*. *Water Air and Soil Pollution*, 21, 183–197.
64. Kukučka M.Đ., Kukučka, N.M. Fizičko-hemijski sastav svetskih prirodnih voda, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2013.
65. Romić, Ž. Arsen u podzemnoj vodi osječčkog vodocrpilišta i oksidacija arsenita pri kondicioniranju vode, Doktorski rad, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2009.
66. Gregor, J. (2001.): Arsenic removal during conventional aluminium-based drinking-water treatment. *Water Research*, 35(7), 1659-1664.

67. Ujevic M., Duic Z., Casiot C., Sipos L., Santo V., Dadic Z., Halamic, J. (2010.): Occurrence and geochemistry of arsenic in the groundwater of Eastern Croatia, *Applied Geochemistry*, 25, 1017–1029.
68. European Union (1998) Council directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, L 330/32, 32–54.
69. Cukrov, N., Cuculic, V., Kowokal, Ž. (2008) Ecotoxic metal sin water and sediment of the southeastern part of Šibenik harbor, Croatia. 3rd International Conference on Ports and Waterways -POWA 2008, 278-286.
70. Dragun, Z., Filipović Marijić, V., Vuković, M., Raspor, B. (2015) Metal Bioavailability in the Sava River Water in R. Milačić et al. (eds.), *The Sava River, The Handbook of Environmental Chemistry* 31, DOI 10.1007/978-3-662-44034-6\_6
71. EU RISK ASSESSMENT - [COPPER, COPPER II SULPHATE PENTAHYDRATE, COPPER(I)OXIDE, COPPER(II)OXIDE, DICOPPER CHLORIDE TRIHYDROXIDE] CAS [7440-50-8, 7758-98-7, 1317-3-1, 1317-38-0, 1332-65-6] *Environment-effects – Appendix L* :
72. Copper compounds (2017). Retrieved October 14, 2017. Dostupno online: <https://toxnet.nlm.nih.gov>
73. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease registry: *Toxicological profile for copper*, September, 2004.
74. IPCS INCHEM, International Programme On Chemical Safety, Environmental Health Criteria 200, Copper. Dostupno online: [www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid57.htm](http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid57.htm)
75. Rajpert L., Skłodowska A., Matlakowska R., *Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast Rhodotorula mucilaginosa LM9*, In *Chemosphere*, Volume 91, Issue 9, 2013, Pages 1257-1265, ISSN 0045-6535
76. Mcgeer, James & Brix, Kevin & Skeaff, James & DeForest, David & Brigham, Sarah & Adams, William & Green, Andrew. (2003). *Inverse Relationship Between Bioconcentration Factor and Exposure Concentration for Metals: Implications for Hazard Assessment of Metals in the Aquatic Environment*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*. 22. 1017-37. 10.1002/etc.5620220509.
77. European Chemicals Agency (ECHA) – Copper. Dostupno online: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15562/5/4/2>
78. Núria de Castro-Català, Maja Kuzmanovic, Neus Roig, Jordi Sierra, Antoni Ginebreda, Damià Barceló, Sandra Pérez, Mira Petrovic, Yolanda Picó, Marta Schuhmacher, Isabel Muñoz, (2016) *Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools*, In *Science of The Total Environment*. 540, 297-306.
79. Filimonova, Valentina, Fernando Gonçalves, João C Marques, Marleen De Troch, and Ana MM Gonçalves. 2016. "Biochemical and Toxicological Effects of Organic (herbicide Primextra® Gold TZ) and Inorganic (copper) Compounds on Zooplankton and Phytoplankton Species." *Aquatic Toxicology* 177: 33–43.

80. *Diane A. Heemsbergen, Mike J. McLaughlin, Mark Whatmuff, Michael St.J. Warne, Kris Broos, Mike Bell, David Nash, Glenn Barry, Deb Pritchard, Nancy Penney, (2010) Bioavailability of zinc and copper in biosolids compared to their soluble salts, In Environmental Pollution, 158, 5: 1907-1915.*
81. *SCHER, scientific opinion on the voluntary risk assessment report on copper and its compounds, environmental part, 12 February 2009.*
82. *NAS, Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants Copper (1974)*
83. *USEPA, Ambient Water Quality Criteria Doc: Copper (1980) EPA 440/5-80-036.*
84. *USEPA, Health Issue Assessment: Copper (1987) EPA/600/8-87/001.*
85. *USEPA, Drinking Water Criteria Document for Copper (Final Draft) (1985) EPA-600/X-84-190-1*
86. *USEPA, Ambient Water Quality Criteria Doc: Copper (1984) EPA 440/5-84-031.*
87. *WFD-UKTAG, Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: copper (2012); Dostupno online:  
<https://www.wfduk.org/sites/default/files/Media/Copper%20saltwater%20-%20UKTAG.pdf>*
88. *US EPA, AQUATIC LIFE AMBIENT FRESHWATER QUALITY CRITERIA – COPPER (2007); Dostupno online:  
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1000PXC.PDF?Dockey=P1000PXC.PDF>*
89. *Institut Ruđer Bošković (IRB), Elaborat stanja okoliša na području buduće plaže na području bivše Tvornice elektroda i ferolegura u Šibeniku, 2011.*
90. *EKONERG I PMF; korisnik: Agencija za zaštitu okoliša (AZO) Kemijski monitoring - Računanje i kartiranje kritičnog opterećenja onečišćenja iz zraka na površinske vode na odabranim lokacijama Republike Hrvatske (Duška Šaša, dipl.inž., EKONERG i Sandra Hudina, dipl. inž., PMF), 2008.*
91. *European Copper Institute, 2013, ACUTE & CHRONIC ECOTOXICITY OF SOLUBLE COPPER SPECIES IN VIEW OF HAZARD CLASSIFICATION OF COPPER AND COPPER COMPOUNDS UPDATE OF EU RA APPENDIX K1.*
92. *EU RISK ASSESSMENT - [COPPER, COPPER II SULPHATE PENTAHYDRATE, COPPER(I)OXIDE, COPPER(II)OXIDE, DICOPPER CHLORIDE TRIHYDROXIDE] CAS [7440-50-8, 7758-98-7, 1317-3-1, 1317-38-0, 1332-65-6] Chapter 3.2-Environmental effects-marine effects*
93. *European Union Risk Assessment Report - Zinc Metal (2010) JRC61245. Dostupno online:  
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC61245>*
94. *Dostupno online: <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.028.341>*
95. *Toxicological profile for zinc, (2005). US Department of health and human services, Public health service, Agency for toxic substances and disease registry. Dostupno online:  
<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>*
96. *Water Framework Directive - United Kingdom Technical Advisory Group (WFD-UKTAG), 2010. Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: zinc.*

97. Zn fact Sheet. UK Environment Agency, 2010. Dostupno online:  
[https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/environmental/scher\\_o\\_157.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental/scher_o_157.pdf)
98. US EPA. Water quality criteria documents for the protection for the protection of aquatic life in ambient water, 1995 updates. Dostupno online:  
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20002924.PDF?Dockkey=20002924.PDF7>
99. Ritchie E., Boyd, P., Lawson-Halasz, A., Hawari, J., Saucier, S., Scroggins, R., Princz, J. (2017) The ecotoxicity of zinc and zinc-containing substances in soil with consideration of metal-moiety approaches and organometal complexes. *Environmental toxicology and chemistry*, 9999: 1-9.
100. Nys, C., Janssen, C.R., De Schamphelaere K.A.C. (2017) The effect of pH on chronic zinc toxicity differs between daphnid species: development of a preliminary chronic zinc *Ceriodaphnia dubia* bioavailability model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(10): 2750-2755.
101. Van Regenmortel T., Berteloot, O., Janssen, C.R., De Schamphelaere K.A.C. (2017) Analyzing the capacity of the *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata* bioavailability models to predict chronic zinc toxicity at high pH and low calcium concentrations and formulation of a generalized bioavailability model for *D. magna*. *Environmental toxicology and chemistry* 36(10): 2781-2798.
102. Hogstrand, C. (2012) Chapter 3: Zinc In: Homeostasis and toxicology of essential metals: Volume 31A, Fish physiology Volume 31A (Eds: Wood C.H. et al.), Academic Press, London, UK, pp. 136-184.
103. Muysen B.T., De Schamphelaere K.A., Janssen C.R. (2006) Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 36(10): 393-401.
104. De Schamphelaere, K.A.C., Heijerick, D.G., Janssen, C.R. (2003) Development and Validation of Biotic Ligand Models for Predicting Chronic Zinc Toxicity to Fish, Daphnids and Algae (Final report of ILZRO project ZEH-WA-1) Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Ghent University, Belgium (Sponsor: International Lead and Zinc Research Organization, ILZRO, United States).
105. Dragun Z., Roje V, Mikac N, Raspor B, 2009, Preliminary assessment of total dissolved trace metal concentrations in Sava River water. *Environ Monit Assess* 159:99–110.
106. Vidmar J., Zuliani T., Novak P., Drinčić A., Ščanar J., Milačić R., 2016. Elements in water, suspended particulate matter and sediments of the Sava River. *J Soils Sediments* DOI 10.1007/s11368-016-1512-4
107. Acute toxicity of copper, lead, zinc and their mixtures on the sea urchin *Evechinus chloroticus*, Agnes M. Rouchon & Nicole E. Phillips, 2016.