

METODOLOGIJA PROVOĐENJA MONITORINGA PRIORITETNIH TVARI U BIOTI U POVRŠINSKIM KOPNENIM VODAMA



Zagreb, prosinac 2024.

INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ

**Bijenička cesta 54
10000 Zagreb
Hrvatska**



METODOLOGIJA PROVOĐENJA MONITORINGA PRIORITETNIH TVARI U BIOTI U POVRŠINSKIM KOPNENIM VODAMA

HRVATSKE VODE - 374

Primljeno:	11.12.2024. 10:10:04
Klasifikacijska oznaka	Org. jed.
325-08/24-07/0000024	374-1-2/314
Urudžbeni broj:	Prilog
383-24-9	



080517825

Voditelj studije

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

Ravnatelj

Institut Ruđer Bošković



Dr. sc. David Matthew Smith

Zagreb, prosinac 2024.

Izradu metodologije proveli:

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

Dr. sc. Nevenka Mikac

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

Dr. sc. Perica Mustafić

Dr. sc. Jasna Lajtner

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, rujan 2018.

Reviziju metodologije provela:

Dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

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

Zagreb, prosinac 2024.

SADRŽAJ

POPIS TABLICA	1
POPIS SLIKA	2
POJMOVNIK STRUČNIH IZRAZA I KRATICA	3
1. UVOD	4
2. CILJEVI DONOŠENJA SKVO ZA BIOTU I NAČIN DEFINIRANJA SKVO _{biota}	4
3. PREPORUKE ZA PROVOĐENJA MONITORINGA BIOTE U OKVIRU EUROPSKE DIREKTIVE O VODAMA	7
3.1. Osmišljavanje programa uzorkovanja	7
3.2. Odabir vrste monitoringa (pasivni ili aktivni biomonitoring)	8
3.2.1. Preporuke za provođenje pasivnog biomonitoringa	10
3.3. Obrada i prikaz rezultata	11
3.3.1. Normalizacija na sadržaj masti i suhe tvari	11
3.3.2. Utjecaj trofičkog nivoa na ocjenu sukladnosti sa SKVO _{biota}	12
3.3.3. Opis primjene pasivnih uzorkivača kao alternativa monitoringu prioriternih tvari u bioti	13
4. PROBLEM USKLAĐIVANJA REZULTATA MONITORINGA BIOTE SA SKVO _{biota} ZA NEKE PRIORITETNE TVARI	14
5. IZBOR VRSTA RIBA ZA ODREĐIVANJE PRIORITETNIH TVARI U POVRŠINSKIM KOPNENIMA VODAMA	15
5.1. Ugroženost i zaštita odabranih vrsta riba	17
5.2. Ekologija odabranih vrsta riba	18
5.3. Trofički nivo odabranih vrsta riba	22
6. Izbor beskrležnjaka za određivanje prioriternih tvari u površinskim kopnenim vodama	23
6.1. Problemi pri uzorkovanju beskrležnjaka u nekim površinskim kopnenim vodama u okviru provedenih monitoring studija u periodu od 2018. do 2023.	26
7. ZAKLJUČAK	26
8. LITERATURA	28
9. PRILOZI	32
9.1. Naputak za uzorkovanje i pripremu uzoraka riba za provođenje monitoringa u površinskim kopnenim vodama	32
9.1.1. Vrsta riba, preporučena dužina i starost te period uzorkovanja	32
9.1.2. Način uzorkovanja riba	35
9.1.3. Obrada i priprema uzoraka riba za analizu	36
9.2. Naputak za uzorkovanje i pripremu uzoraka beskrležnjaka za provođenje monitoringa biote u površinskim kopnenim vodama	39
9.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka školjkaša	39
9.2.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka puževa	40
9.2.3. Uzorkovanje i priprema uzoraka rakušaca	43

POPIS TABLICA

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

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

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

Tablica 3.1. Prednosti i ograničenja pasivnog i aktivnog biomonitoringa.

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

Tablica 5.2. Status ugroženosti i zaštite odabranih vrsta riba

Tablica 5.3. Ekološki zahtjevi odabranih vrsta riba

Tablica 5.4. Trofički nivo odabranih vrsta riba

Tablica 9.1. Popis postaja na kojima nije moguće provesti uzorkovanje riba

Tablica 9.2. Količina uzorka potrebna za analizu pojedinih prioritetnih tvari u cijelim ribama i u mišiću riba (podaci iz monitoring studija provedenih 2018.-2023. godine).

Tablica 9.3. Preporučena vrsta školjkaša za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučen period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

Tablica 9.4. Količina uzorka potrebna za analizu fluorantena i benzo(a)pirena u školjkašima (podaci iz monitoring studija provedenih 2018.-2023. godine)

Tablica 9.5. Preporučena vrsta puževa za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučen period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

Tablica 9.6. Količina uzorka potrebna za analizu fluorantena i benzo(a)pirena u puževima (podaci iz monitoring studija provedenih 2018.-2022. godine)

Tablica 9.7. Preporučena vrsta rakušaca za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučen period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

POPIS SLIKA

Slika 9.1. Karta u HRTS96 projekciji s upisanim lokacijama na kojima su predložene reprezentativne vrste riba za sva vodna tijela rijeka površine sliva veće od 10 km² i jezera površine veće od 0,5 km² u Republici Hrvatskoj

Slika 9.2. Određivanje osnovnih biometrijskih čimbenika riba: a) ukupne dužine na ihtiometri; b) ukupne mase na laboratorijskoj vagi

Slika 9.3. Priređeni uzorci riba nakon seciranja: a) mišić riba usitnjen škarama; b) cijela riba usitnjena štapnim mikserom/sjeckalicom

Slika 9.4. Liofilizirani uzorak: a) mišića ribe; b) cijele ribe

Slika 9.5. Određivanje osnovnih biometrijskih čimbenika školjkaša: a) ukupne dužine pomičnim mjerilom; b) ukupne mase na laboratorijskoj vagi

Slika 9.6. Odvojeno meko tkivo puževa za daljnju obradu

Slika 9.7. Liofilizirano meko tkivo puževa za daljnju obradu

Slika 9.8. Sakupljanje jedinki rakušaca u svrhu pripreme uzoraka za analize prioriternih tvari

POJMOVNIK STRUČNIH IZRAZA I KRATICA

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

BaP – benzo(a)piren

CF – kondicijski faktor (engl. *condition factor*)

Flu – fluoranten

HBCDD – heksabromociklododekan

HCB – heksaklorbenzen

HCBD – heksaklorbutadien

Hg – živa

LDPE – polietilen niske gustoće (engl. *low density polyethylene*)

m.t. – mokra težina

ODV – okvirna direktiva o vodama

PAH – poliaromatki ugljikovodici

Pasivni biomonitoring – uzorkovanje nativnih organizama

PBDE – polibromirani difenileteri

PDMS – polidimetilsiloksan

PFOS – perfluorooktansulfonska kiselina

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

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

SKVO – standard kakvoće vodnog okoliša

SKVO_{biota} – standard kakvoće okoliša za biotu

SPMD - polupropusne membrane (engl. *semipermeable membrane device*)

s.t. – suha težina

TBT – tributil kositar (engl. - *tributyltin*)

TE – toksični ekvivalent

TL – trofički nivo (engl. *trophical level*)

TMF – faktor trofičkog obogaćenja (engl. *trophic magnification factor*)

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

1. UVOD

U Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019, 20/2023 i 50/2023-ispravak, u daljnjem tekstu Uredba) propisani su standardi kakvoće vodnog okoliša (SKVO) za određene pokazatelje u bioti i ocjena kemijskog stanja voda s obzirom na njih, a u skladu s Okvirnom direktivom o vodama Europske unije 2000/60/EZ (EC 2000), Direktivom 2008/105/EZ o standardima kakvoće okoliša (EC 2008) i Direktivom 2013/39/EU (EU 2013) o izmjeni direktiva 2000/60/EZ i 2008/105/EZ u odnosu na prioritetne tvari u području vodne politike. U Direktivi iz 2008. su bili propisani SKVO za biotu, kao i za vodu, za živu, heksaklorbenzen i heksaklorbutadien, a u Direktivi iz 2013. godine uvedeni su SKVO za biotu za fluoranten, poliaromatske ugljikovodike i bromirane difeniletere s liste prioritetnih tvari iz 2008. godine te za sljedeće nove prioritetne tvari – dikofol, perfluorooktan sulfonsku kiselinu i njezine derivate, dioksine i spojeve poput dioksina, heksabromociklododekan te heptaklor i heptaklorepoksid. Propisani SKVO se odnose na ribu, osim u slučaju poliaromatskih ugljikovodika i fluorantena, čiji standardi se odnose na rakove i mekušce (školjkaši, puževi).

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

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

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

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

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

Tvari koje treba ispitivati u bioti propisane su u Uredbi te su trenutno u Europi i Hrvatskoj SKVO za biotu definirani za 11 prioriteta tvari koje su navedene u Tablici 2.1., a utvrđene su na osnovu ekotoksikoloških testova o toksičnim učincima navedenih tvari na istraživane organizme, uzimajući u obzir i odgovarajući faktor procjene rizika.

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

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

*TE- toksični ekvivalenti prema čimbenicima toksične ekvivalencije

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1. Osmišljavanje programa uzorkovanja

Sustavno istraživanje ekološkog i kemijskog stanja slatkovodnih ekosustava u Republici Hrvatskoj organizira se na način da se može ocijeniti ekološko i kemijsko stanje unutar razmatranog vodnog tijela. Uzorkovanje biote može se provoditi unutar nadzornog, operativnog ili istraživačkog monitoringa, međutim najčešće se provodi unutar nadzornog

monitoringa. U Dokumentu br. 32 (EC, 2014a) preporučeno je da se za usklađivanje sa SKVO_{biota} uzorkovanje provodi najmanje jednom godišnje, osim ako se stručno ne donese prijedlog neke druge frekvencije uzorkovanja. Isti dokument za monitoring vremenskih trendova preporuča uzorkovanje biote najmanje jednom u tri godine. Na temelju dosadašnjih monitoring studija Identifikacije opasnih tvari u bioti te praćenje njihovih koncentracija na postajama površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske u periodu 2018.-2023. godine, predlažemo da se analize u bioti provode na nadzornim postajama jednom u tri godine, a na operativnima svake godine. Iz praktičnih razloga trebalo bi razmotriti mogućnost kombiniranja uzorkovanje biote za kemijski monitoring s uzorkovanjem biote za ekološki monitoring, čime se osigurava smanjenje troškova, kao i kompletna biološka karakterizacija biote koja se koristi u kemijskom monitoringu. Potreban broj uzoraka biote koji bi omogućio pouzdanu ocjenu dobivenih rezultata s obzirom na definirane SKVO za biotu ovisi o očekivanoj (mjerenoj) varijabilnosti koncentracije između uzoraka i zadanom nivou pouzdanosti kod procjene da li izmjerena koncentracija prelazi zadani SKVO_{biota}. Varijabilnost koncentracija na pojedinoj lokaciji trebala bi se utvrditi analizom većeg broja individualnih uzoraka biote za što bi bio potreban dodatni istraživački monitoring. S obzirom da su sredstva za takve svrhe obično ograničena, smatra se da kombinirani uzorci biote koji sadrže više individualnih uzoraka daju dovoljno dobru procjenu srednje koncentracije pojedine prioritetne tvari u bioti na određenoj lokaciji, premda je tim pristupom izgubljen podatak o varijabilnosti koncentracija.

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

3.2. Odabir vrste monitoringa (pasivni ili aktivni biomonitoring)

Prilikom monitoringa biote mogu se koristiti dva pristupa, pasivni monitoring (uzorkovanje nativnih organizama) i aktivni monitoring (korištenje uzgajanih organizama koji se izlažu na postajama gdje nije moguće uzorkovati native organizme). Svaki od dva pristupa biomonitoringu ima prednosti i ograničenja, kao što je ukratko navedeno u Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Prednosti i ograničenja pasivnog i aktivnog biomonitoringa.

	Pasivni biomonitoring (korištenje nativnih organizama)	Aktivni biomonitoring (korištenje uzgajanih organizama)
Prednosti	• Relativno jednostavno provođenje uzorkovanja • Moguća ocjena dugoročnog zagađenja • Najčešće korišten, postoji definirana standardna metodologija • Relevantan za lokalnu ekologiju	• Ograničen broj vrsta organizama • Moguć izbor mjesta i vremena uzorkovanja • Poznato vrijeme izloženosti zagađenju • Moguća kontrola biotičkih parametara (ista veličina, spol, starost) • Moguć izbor vrste i podrijetla organizma • Moguća ponovljivost • Predvidljivost troškova i trajanja uzorkovanja
Ograničenja	• Ovisi o geografskoj rasprostranjenosti vrste • Pokretljivost i migracije vrsta • Broj i vrsta jedinki može varirati među lokacijama • Nepoznato vrijeme izloženosti zagađenju • Razlike u bioakumulaciji spojeva ovisе o vrsti • Biotički faktori (spol, starost, veličina) utječu na rezultat • Mogući utjecaj na lokalnu populaciju • Mogući negativan učinak na zaštićene i endemske vrste ograničenog areala	• Nije primjenjiv na sve vrste • Način uzgoja može utjecati na izloženost i biološke odgovore organizma • Ukazuje samo na kratkoročni utjecaj zagađenja • Pristup hrani/briga o organizmima • Ne postoji standardizirana metodologija • Primjenjuje se rijetko • Dobrobit životinja • Kavezni uzgoj može utjecati na zdravstveno stanje organizama, a time i bioakumulaciju • Nisu realni uvjeti izloženosti, posebno utjecaj sedimenta

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

3.2.1. Preporuke za provođenje pasivnog biomonitoringa

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

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

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

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

3.3. Obrada i prikaz rezultata

3.3.1. Normalizacija na sadržaj masti i suhe tvari

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

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

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

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

Za ribe:

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

Za školjkaše:

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

Za rakove i puževe:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Najveći problem u tom smislu predstavlja vrlo niska vrijednost za SKVO za Hg u ribama (10 µg/kg m.t.) koja je definirana za zaštitu od sekundarnog trovanja ptica i sisavaca koji se hrane ribama. Svi dostupni podatci o koncentracijama Hg u slatkovodnim i morskim ribama, pogotovo za vrste koje zadovoljavaju zahtjeve za monitoring (svežderi ili mesojedi, starost 3-5 godina, TL = 3,5 - 4,5) znatno su viši od propisane SKVO vrijednosti (Živković i sur., 2017; OSPAR 2016; Vignati i sur., 2013). Provedene monitoring studije Identifikacije opasnih tvari u bioti te praćenje njihovih koncentracija na postajama površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske u periodu 2018.-2023. godine potvrdile su izmjerene više vrijednosti masenih udjela Hg od onih propisanih SKVO vrijednostima za Hg u bioti gotovo na svim lokalitetima. Ovdje je važno istaknuti da je vrijednost SKVO za Hg u ribama, koja je na osnovu toksikoloških efekata definirana u Uredbi, niža od svih vrijednosti masenih udjela Hg u ribama navedenih u dostupnoj literaturi. OSPAR-ova komisija je u 2016. godini napravila studiju „Procjena žive u morskom okolišu, usporedba kriterija (EAC/EQS) za živu“ u kojoj je pokazano da uz primjenu SKVO kriterija (uz korekciju na traženi trofički nivo za školjkaše i ribe koje se nalaze na nižim TL) niti jedna od 12 europskih zemalja koja sudjeluje u monitoringu u okviru OSPARA nije zadovoljila SKVO kriterij za Hg. U istom izvješću se, međutim, navodi da je s ekotoksikološkog aspekta SKVO za Hg opravdano tako

nizak, premda je napomenuto da su laboratorijska ekotoksikološka ispitivanja u stvari nedostatna. U istom izvješću je naglašeno da korekcije na potreban trofički nivo ne bi trebalo provoditi koristeći generičke podatke o TL za pojedine organizme, nego da bi trebalo odrediti TL za analizirane vrste u lokalnim vodenim sustavima, jer upotreba generičkih podataka dovodi do velikih pogrešaka. U kratkom osvrtu na to kako zemlje članice mogu pristupiti problemu nezadovoljavanja kriterija za SKVO za biotu za Hg Vignati i sur. (2013) navode nekoliko opcija koje se mogu razmotriti: korištenje SKVO bazirano na koncentraciji Hg u vodi; mjerenje Hg u nižim organizmima, npr. školjkašima, ili prilagođavanje SKVO vrijednosti pojedinoj zemlji ovisno o nivou Hg u ribama (određivanje lokalnih bazičnih koncentracija). Međutim, u diskusiji autori odbacuju sve te tri ideje kao rješenje i predlažu da se počne provoditi prošireni monitoring Hg u bioti koji bi omogućio definiranje raspona koncentracija za pojedine organizme i vremenskih trendova, a onda i posljedično možda omogućio donošenje manje striktnih kriterija za SKVO za Hg u bioti. Naime, bioakumulacija i biomagnifikacija Hg u vodenom trofičkim lancu je izuzetno kompleksna i u velikoj mjeri ovisi o biogeokemijskim karakteristikama samog sustava, a ne samo o stupnju zagađenja okoliša živom (Cossa i sur., 2012).

Za polibromirane difeniletere (PBDE) također je postavljena vrlo niska vrijednost za SKVO za biotu od 0,0085 µg/kg m.t. Rezultati znanstvenih istraživanja u riječnim ribama diljem Europe (Eljarrat i Barcelo, 2018) i monitoringa morske biote (HELCOM, 2018) pokazuju da je trenutačno situacija takva da sve mjerene koncentracije daleko premašuju SKVO za PBDE, a to su pokazale i do sada provedene monitoring studije Identifikacije opasnih tvari u bioti te praćenje njihovih koncentracija na postajama površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske u periodu 2018.-2023. godine. Premda višegodišnji trendovi u morskim (HELCOM, 2018) i slatkovodnim (Eljarrat i Barcelo, 2018) ribama pokazuju da se koncentracije PBDE-ova u ribama smanjuju, jer upotreba PBDE-ova opada nakon što je njihovo korištenje zabranjeno u Europskoj uniji 2004. godine, nije za očekivati da će navedeni kriterij biti dosegnut, kako je propisano u Uredbi. Dakle, u okviru monitoringa biote u slatkovodnim ekosustavima svakako bi trebalo provoditi kontinuirani monitoring PBDE-ova u bioti da se utvrde trendovi i eventualne promjene njihove koncentracije.

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

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

Rijeke prema zajednici riba možemo podijeliti u zone pa se sastav zajednice riba mijenja kako se mijenjaju ekološki uvjeti u toku. Najuzvodnija zona je zona pastrve koju karakterizira brz tok i hladna voda bogata otopljenim kisikom. Broj vrsta u toj je zoni relativno malen i dominiraju reofilne vrste: pastrva, pijor, lipljen i mladica. Sljedeća je zona mrene koju karakterizira manje brzi tok te voda koja ljeti premašuje 15 °C i siromašnija je kisikom. Karakteristične vrste za tu zonu su mrena, klen i podust. Sljedeća je zona deverike koju karakterizira još sporiji tok s temperaturom vode ljeti preko 20 °C i još nižim razinama kisika. Tipične vrste te zone su deverika, šaran i jez (Duplić, 2008). Naravno, ova se zonacija primjenjuje samo na velikim i dugačkim rijekama pa je za manje tekućice i sve stajaćice potrebno primijeniti drugu metodologiju. Posebno je važno naglasiti raznolikost riba u jadranskom slivu u kojem prethodno spomenuta zonacija ne vrijedi i u kojem gotovo svaka rijeka ima svoju jedinstvenu riblju zajednicu.

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

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

Vrsta riba	Znanstveno ime	Starost (godine)	Totalna dužina (mm)	Vrijeme uzorkovanja	Period mrijesta
dvoprugasta uklija	<i>Alburnoides bipunctatus</i>	3 do 5	80 do 140	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
uklija	<i>Alburnus alburnus</i>	3 do 5	80 do 140	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
patuljasti somić	<i>Ameiurus melas</i>	3 do 5	130 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
jegulja	<i>Anguilla anguilla</i>	3 do 25	300 do 550	15.4. do 30.9.	-
potočna mrena	<i>Barbus balcanicus</i>	3 do 5	120 do 200	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
mrena	<i>Barbus balcanicus</i>	3 do 5	120 do 200	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
mren	<i>Barbus plebejus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
babuška	<i>Carassius gibelio</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
štuka	<i>Esox lucius</i>	1 do 3	300 do 700	15.4. do 30.9.	1.2. do 31.3.
gambuzija	<i>Gambusia affinis</i>	1 do 3	20 do 50	cijela godina	-
jez	<i>Leuciscus idus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.

Vrsta riba	Znanstveno ime	Starost (godine)	Totalna dužina (mm)	Vrijeme uzorkovanja	Period mriješta
glavočić okrugljak	<i>Neogobius melanostomus</i>	3 do 5	50 do 150	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.
kalifornijska pastrva	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3 do 5	100 do 250	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.
grgeč	<i>Perca fluviatilis</i>	3 do 5	120 do 190	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
basak	<i>Rutilus basak</i>	3 do 5	120 do 170	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
bodorka	<i>Rutilus rutilus</i>	3 do 5	100 do 140	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
primorska pastrva	<i>Salmo farioides</i>	3 do 5	100 do 250	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.
potočna pastrva	<i>Salmo trutta</i>	3 do 5	100 do 250	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.
drlja	<i>Scardinius dergle</i>	3 do 5	120 do 170	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
peškelj	<i>Scardinius plotizza</i>	3 do 5	120 do 170	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
klen	<i>Squalius cephalus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
ilirski klen	<i>Squalius illyricus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
bijeli klen	<i>Squalius squalus</i>	3 do 5	120 do 250	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
zrmanjski klen	<i>Squalius zrmanjæ</i>	3 do 5	100 do 200	1.6. do 31.10.	1.4. do 31.5.
lipljen	<i>Thymallus thymallus</i>	3 do 5	100 do 250	1.4. do 30.9.	1.10. do 31.3.

5.1. Ugroženost i zaštita odabranih vrsta riba

Pregled statusa ugroženosti i zaštite odabranih riba prikazan je u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Status ugroženosti i zaštite odabranih vrsta riba

Znanstveno ime	Direktiva o staništima	Bernska konvencija	Hrvatski Crveni popis *	Stupanj zaštite
<i>Alburnoides bipunctatus</i>		III	LC	-
<i>Alburnus alburnus</i>			LC	-
<i>Ameiurus melas</i>			-	-
<i>Anguilla anguilla</i>	V		VU	strogo zaštićena samo u Vranskom jezeru kod Biograda i u NP Krka
<i>Barbus balcanicus</i>	II, V	III	VU	-

Znanstveno ime	Direktiva o staništima	Bernska konvencija	Hrvatski Crveni popis *	Stupanj zaštite
<i>Barbus barbus</i>			LC	-
<i>Barbus plebejus</i>	II, V	III	VU	strogo zaštićena samo unutar granica PP Velebit
<i>Carassius gibelio</i>			-	-
<i>Esox lucius</i>			-	-
<i>Gambusia affinis</i>			-	-
<i>Leuciscus idus</i>			VU	-
<i>Neogobius melanostomus</i>			-	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i>			-	-
<i>Perca fluviatilis</i>			-	-
<i>Rutilus basak</i>			NT	-
<i>Rutilus rutilus</i>			-	-
<i>Salmo fario</i>			EN	-
<i>Salmo trutta</i>			VU	-
<i>Scardinius dergle</i>			NT	-
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>			-	-
<i>Scardinius plotizza</i>			DD	-
<i>Squalius cephalus</i>			-	-
<i>Squalius illyricus</i>		III	VU	-
<i>Squalius squalus</i>			-	-
<i>Squalius zrmanjiae</i>			VU	strogo zaštićena samo unutar granica PP Velebit
<i>Thymallus thymallus</i>			VU	

* kategorija ugroženosti vrsta prema IUCN (Međunarodni savez za očuvanje prirode, eng. *International Union for Conservation of Nature*: LC – najmanje zabrinjavajuća; VU – osjetljiva; NT – gotovo ugrožena; EN – ugrožena; DD – nedovoljno poznata)

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

5.2. Ekologija odabranih vrsta riba

Podjela vrsta u ekološke grupe omogućuje podatke o strukturnom i funkcionalnom sastavu zajednice riba. Kako bi se procijenila struktura zajednice riba i ekološke značajke, svakoj zabilježenoj vrsti dodijeljena je pripadnost pojedinoj ekološkoj grupi na temelju vlastitih

zapažanja te literaturnih podataka (Kottelat i Freyhof, 1972). Za potrebe analize u ovoj studiji ograničili smo se na podjelu vrsta u ekološke grupe koje se najčešće koriste u analizama (Tablica 5.3.).

Vrste riba odabrane za potrebe ovog istraživanja su po stanišnim grupama podijeljene u 3 kategorije: reofilne, limnofilne i euritopne, pri čemu reofilne vrste preferiraju tekuću vodu, limnofilne stajaću, a euritopne vrste nemaju posebne preferencije prema nekom tipu staništa tj. koriste oba tipa bez problema. Podjela na hranidbene grupe prilagođena je ihtiofauni europskih voda. Svaka vrsta je dodijeljena jednoj od prehrambenih grupa prema dominantnom sastavu hrane odrasle jedinke. Vrste odabrane za potrebe ovog istraživanja su kukcožderi, svežderi, ribožderi-kukcožderi i ribožderi (Tablica 5.3.).

Klasifikacije u reproduktivne grupe napravljena je prema značajkama reproduktivnog staništa, odnosno prema ekološkim uvjetima mjesta na koja se polažu jaja. Riba odabrane za potrebe ovog istraživanja su litofili, fitofili i fito-litofili. Većina odabranih vrsta riba po grupama tolerancije, odnosno prema osjetljivosti vrsta na specifične pritiske, spada u tolerantne ili srednje tolerantne vrste (Tablica 5.3.). Osjetljivost vrsta u prirodnim uvjetima vrlo je teško procijeniti te je stoga i prilično teško definirati osjetljivost riba jer zahtijeva opsežne podatke o biologiji i ekologiji pojedine vrste. Na primjer, pojedina zajednička značajka tolerancije rezultat je kombinacije obiju zasebnih značajki. Pojedine vrste imaju veću toleranciju na promjene u fizikalno-kemijskoj kakvoći vode, a manju prema hidromorfološkim promjenama staništa pa je kod tih vrsta prednost dana onoj značajki koja ih više karakterizira. Netolerantne vrste su karakteristične za gornje tokove rijeka pa ih se nije moglo izbjeći kako bi se pokrila sva staništa.

Odabrane vrste riba po dužini života spadaju u kratkoživuće, srednježivuće i dugoživuće vrste. Kratkoživuće vrste žive manje od 5 godina, srednježivuće vrste žive 5 do 15 godina, a dugoživuće vrste žive više od 15 godina. Potrebno je napomenuti da sve odabrane vrste dožive 5 godina. Što se tiče migratornih grupa, odabrane vrste spadaju u skupine riba koje ne migriraju ili koje migriraju na udaljenostima manjima od 30 km (Tablica 5.3.). Jedina je iznimka jegulja koja poduzima duge migracije i mrijesti se u Sargaškom moru. Ipak, jegulja se mrijesti samo jednom u životu i za vrijeme slatkovodne faze ne migrira što je čini pogodnom vrstom za ovu vrstu istraživanja.

Tablica 5.3. Ekološki zahtjevi odabranih vrsta riba

Vrsta riba	Znanstveno ime	Stanišna grupa	Prehrambena grupa	Stanište hranjenja	Trofički nivo	Reproduktivna grupa	Tolerancija	Dužina života	Migracije
dvoprugasta uklija	<i>Alburnoides bipunctatus</i>	reofilna	kukcožder	vodeni stupac	$2,9 \pm 0,35$	litofil	netolerantna	kratkoživuća	ne migrira
uklija	<i>Alburnus alburnus</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	$2,7 \pm 0,29$	fito-litofil	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
crni somić	<i>Ameiurus melas</i>	limnofilna	svežder	dno	$3,8 \pm 0,4$	fitofil	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
jegulja	<i>Anguilla anguilla</i>	euritopna	svežder	dno	$3,6 \pm 0,3$	-	tolerantna	dugoživuća	duge
potočna mrena	<i>Barbus balcanicus</i>	reofilna	svežder	dno	$3,2 \pm 0,4$	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke
mrena	<i>Barbus barbus</i>	reofilna	svežder	dno	$3,1 \pm 0,39$	litofil	tolerantna	dugoživuća	kratke
mren	<i>Barbus plebejus</i>	reofilna	svežder	dno	$3,4 \pm 0,51$	litofil	tolerantna	dugoživuća	kratke
babuška	<i>Carassius gibelio</i>	euritopna	svežder	dno	$2,5 \pm 0,0$	fitofil	tolerantna	dugoživuća	kratke
štuka	<i>Esox lucius</i>	euritopna	ribožder	vodeni stupac	$4,1 \pm 0,4$	fitofil	srednje tolerantna	dugoživuća	kratke
gambuzija	<i>Gambusia affinis</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	$3,1 \pm 0,2$	živorodna	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
jez	<i>Leuciscus idus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,8 \pm 0,59$	fito-litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
glavočić okrugljak	<i>Neogobius melanostomus</i>	euritopna	svežder	dno	$3,3 \pm 0,1$	litofil	tolerantna	srednježivuća	kratke
kalifornijska pastrva	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	reofilna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	$4,1 \pm 0,3$	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke
grgeč	<i>Perca fluviatilis</i>	euritopna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	$4,4 \pm 0,0$	fito-litofil	tolerantna	kratkoživuća	ne migrira
basak	<i>Rutilus basak</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	$3,0 \pm 0,2$	fito-litofil	tolerantna	srednježivuća	kratke
bodorka	<i>Rutilus rutilus</i>	euritopna	svežder	vodeni stupac	$3,0 \pm 0,0$	fito-litofil	tolerantna	srednježivuća	kratke
primorska pastrva	<i>Salmo farioides</i>	reofilna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	$3,5 \pm 0,5$	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke
potočna pastrva	<i>Salmo trutta</i>	reofilna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	$3,4 \pm 0,1$	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke

Vrsta riba	Znanstveno ime	Stanišna grupa	Prehrambena grupa	Stanište hranjenja	Trofički nivo	Reproduktivna grupa	Tolerancija	Dužina života	Migracije
drlja	<i>Scardinius dergle</i>	limnofilna	svežder	vodeni stupac	$2,9 \pm 0,39$	fitofil	srednje tolerantna	srednježivuća	ne migrira
crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	limnofilna	svežder	vodeni stupac	$2,9 \pm 0,39$	fitofil	srednje tolerantna	srednježivuća	ne migrira
peškelj	<i>Scardinius plotizza</i>	limnofilna	svežder	vodeni stupac	$2,9 \pm 0,39$	fitofil	srednje tolerantna	srednježivuća	ne migrira
klen	<i>Squalius cephalus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$2,7 \pm 0,1$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
ilirski klen	<i>Squalius illyricus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,5 \pm 0,37$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
bijeli klen	<i>Squalius squalus</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,4 \pm 0,5$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
zrmanjski klen	<i>Squalius zrmanjae</i>	reofilna	svežder	vodeni stupac	$3,4 \pm 0,4$	litofil	srednje tolerantna	kratkoživuća	kratke
lipljen	<i>Thymallus thymallus</i>	reofilna	ribožder-kukcožder	vodeni stupac	$3,1 \pm 0,42$	litofil	netolerantna	srednježivuća	kratke

5.3. Trofički nivo odabranih vrsta riba

Trofički nivo odabranih vrsta prikazan je u Tablici 5.4. Gdje je bilo moguće, odabirane su ribe sa što višim trofičkim nivoom. Trofički nivoi dostupnih vrsta riba preuzeti su iz baze stranice Fishbase (www.fishbase.org). Trofički nivo nekih vrsta je još uvijek nepoznat pa je procijenjen na osnovu najbližih srodnika i u tablici je označen sa zvjezdicom.

Tablica 5.4. Trofički nivo odabranih vrsta riba

Znanstveno ime	Trofički nivo
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	$2,9 \pm 0,35$
<i>Alburnus alburnus</i>	$2,7 \pm 0,29$
<i>Ameiurus melas</i>	$3,8 \pm 0,4$
<i>Anguilla anguilla</i>	$3,6 \pm 0,3$
<i>Barbus balcanicus</i>	$3,2 \pm 0,4 *$
<i>Barbus barbus</i>	$3,1 \pm 0,39$
<i>Barbus plebejus</i>	$3,4 \pm 0,51$
<i>Carassius gibelio</i>	$2,5 \pm 0,0$
<i>Esox lucius</i>	$4,1 \pm 0,4$
<i>Gambusia affinis</i>	$3,1 \pm 0,2$
<i>Leuciscus idus</i>	$3,8 \pm 0,59$
<i>Neogobius melanostomus</i>	$3,3 \pm 0,1$
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$4,1 \pm 0,3$
<i>Perca fluviatilis</i>	$4,4 \pm 0,0$
<i>Rutilus basak</i>	$3,0 \pm 0,2 *$
<i>Rutilus rutilus</i>	$3,0 \pm 0,0$
<i>Salmo farioides</i>	$3,5 \pm 0,5 *$
<i>Salmo trutta</i>	$3,4 \pm 0,1$
<i>Scardinius dergle</i>	$2,9 \pm 0,39 *$
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	$2,9 \pm 0,39$
<i>Scardinius plotizza</i>	$2,9 \pm 0,39 *$
<i>Squalius cephalus</i>	$2,7 \pm 0,1$
<i>Squalius illyricus</i>	$3,5 \pm 0,37$
<i>Squalius squalus</i>	$3,4 \pm 0,5 *$
<i>Squalius zrmanjæ</i>	$3,4 \pm 0,4 *$
<i>Thymallus thymallus</i>	$3,1 \pm 0,42$

* Trofički nivo koji još uvijek nije poznat za pojedine vrste te je procijenjen na osnovu najbližih srodnika

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

Izbor beskralježnjaka u kojima se provodi određivanje prioriternih tvari u površinskim kopnenim vodama uključuje mekušce (školjkaši i puževi) i rakove.

Slatkovodni školjkaši su zastupljeni s porodicom Unionidae (lisanke). Karakterizira ih raznolikost oblika i boje ljuštura koje su uvjetovane područjem koje nastanjuju (Killeen i sur., 2004). Od ukupnih slatkovodnih mekušaca Europe, slatkovodni školjkaši čine 6 %. Raznolikost europskih slatkovodnih školjakaša je relativno mala u usporedbi s faunom Sjeverne Amerike i Afrike. U Hrvatskoj je ova porodica zastupljena slijedećim vrstama: bezupka - *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758); *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758); *Anodonta exulcerata* Porro, 1838; *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835); obična lisanka - *Unio crassus* Philipsson, 1788; slikarska lisanka - *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758); *Unio tumidus* Philipsson, 1788; *Unio elongatulus* Pfeiffer, 1825; *Microcondylaea bonellii* (Ferussac, 1827) (Cuttelod i sur., 2011), a početkom 21. stoljeća zabilježena je invazivna strana vrsta istočnoazijska bezupka – *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Lajtner i Crnčan, 2011). Najnovija taksonomska istraživanja vrste *U. crassus* pokazala su da se radi o kompleksu 12 vrsta od kojih u Hrvatskoj dolaze: *Unio crassus* s. str. Philipsson in Retzius, 1788., *Unio vicarius* Westerlund in Westerlund & Blanc, 1879 stat. rev. i *Unio nanus* Lamarck, 1819 stat. rev. (Lopes Lima i sur., 2024). Navedene tri vrste teško je morfološki razlikovati i tek molekularna analiza može potvrditi o kojoj se vrsti radi. Stanište porodice Unionidae su jezera, potoci i rijeke u kojima kao sediment prevladava pijesak i šljunak. Zbog bogatstva hrane u rijekama je, za razliku od potoka, zabilježena i veća raznolikost vrsta. Općenito govoreći unionidni školjkaši se hrane bakterijama i mikroplanktonom. Ličinka glohidija je nametnik na perajama ili škragama riba što je važno za njihovo rasprostranjenje budući da su odrasli školjkaši slabo pokretni.

Predstavnici porodice Unionidae relativno su dostupni na istraživanim lokalitetima. Izuzetak je obična lisanka, *Unio crassus*. Zbog velikog smanjenja brojnosti jedinki vrsta je uvrštena na Dodatak II i IV EU Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore 92/43EECz (NATURA 2000 vrsta), a u Hrvatskoj je strogo zaštićena (Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama, NN 144/2013). Uzorkovanje ove vrste moguće je samo iz znanstveno opravdanih razloga uz posebnu dozvolu Ministarstva za zaštitu okoliša i zelene tranzicije, a jedan od preduvjeta za dobivanje dozvole je velika gustoća populacije. S druge strane, invazivna vrsta *Sinanodonta woodiana* široko je rasprostranjena u Hrvatskoj, najveća je vrsta iz porodice Unionidae (duljina do 30 cm), a ima i dokazan negativan učinak na autohtone vrste školjakaša. Upravo stoga se na svim istraživanim lokalitetima (na kojima je zabilježena) preporučuje uzorkovanje ove vrste umjesto autohtonih vrsta školjakaša. Prilikom sličnih istraživanja, ovisno o dostupnosti, mogu se koristiti i puževi te amfipodni rakovi iz porodice Gammaridae.

Slatkovodna fauna broji oko 4 000 opisanih vrsta puževa koji su prilagođeni širokom spektru staništa (Strong i sur., 2008). U slatkovodnim ekosustavima prisutni su prednjoškržnjaci (Prosobranchiata) i plućnjaci (Pulmonata). Povoljnost staništa za normalan rast i razvoj

puževa ovisi o brojnim abiotičkim i biotičkim faktorima - temperaturi, salinitetu, pH vrijednosti, koncentraciji kalcijevih iona, količini otopljenog kisika, supstratu, strujanju vode, kompeticiji za hranu, predatorima i parazitima (Glöer, 2002). Slatkovodne puževe karakterizira visoka tolerancija na promjene pH vrijednosti vode, prilagodba na nisku koncentraciju natrijevog klorida u vodi (Glöer, 2002), različita tolerancija na temperaturu, život na manjim dubinama i u vodi s većom količinom kalcijevih iona te u staništima s gustom vegetacijom (Pfleger i Chatfield, 1988). Kisik je važan čimbenik za prednjoškržnjake jer oni uzimaju otopljeni kisik iz vode, a za razliku od njih, plućnjaci mogu uzimati atmosferski kisik s vodene površine penjući se na vodenu vegetaciju ili samo plutajući na površini (Glöer, 2002). Tekućice imaju više kisika nego vode stajačice (Glöer, 2002) stoga prednjoškržnjaci uglavnom žive u tekućicama s puno kisika, a plućnjaci preferiraju stajaće ili slabo tekuće vode (Pfleger i Chatfield, 1988).

U Hrvatskoj dolazi oko 250 vrsta slatkovodnih puževa. Porodice prednjoškržnjaka koje su najčešće u kopnenim vodama su Amphimelaniidae, Bithyniidae, Hydrobiidae, Melanopsidae, Neritidae, Valvatidae i Viviparidae, dok su puževi plućnjaci najčešće zastupljeni porodicama Lymnaeidae, Planorbidae i Physidae. Uzevši u obzir malu veličinu kućica puževi iz porodica Hydrobiidae i Valvatidae nisu predloženi za istraživanje.

Popis vrsta puževa predloženih za istraživanje:

Por. Amphimelaniidae

1. *Holandriana holandrii* (C. Pfeiffer, 1828)
syn. *Amphimelania holandrii* (C. Pfeiffer, 1828)

Por. Bithyniidae

2. *Bithynia tentaculata* (Linnaeus, 1758)

Por. Lymnaeidae

3. *Peregriana peregra* (O. F. Müller, 1774)
syn. *Radix labiata* (Rossmässler, 1835)
syn. *Radix peregra* (O. F. Müller, 1774)
4. *Ampullaceana balthica* (Linnaeus, 1758)
syn. *Radix balthica* (Linnaeus, 1758)
syn. *Radix ovata* (Draparnaud, 1805)

Por. Melanopsidae

5. *Microcolpia daudebartii acicularis* (A. Férussac, 1823)
syn. *Fagotia acicularis* (A. Férussac, 1823)
6. *Esperiana esperi* (A. Férussac, 1823)
syn. *Fagotia esperi* (A. Férussac, 1823)

Por. Neritidae

7. *Theodoxus danubialis* (C. Pfeiffer, 1828)
8. *Theodoxus fluviatilis* (Linnaeus, 1758)

Por. Physidae

9. *Physella acuta* (Draparnaud, 1805)

Por. Planorbidae

10. *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758)

Por. Viviparidae

11. *Viviparus acerosus* Bourguignat, 1862
12. *Viviparus contectus* (Millet, 1813)
13. *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758)

Slatkovodni mekušci predstavljaju jednu od najugroženijih skupina životinja (Lydeard i sur., 2004). Glavni razlozi smanjenja broja vrsta i pada gustoće populacija mogu se pripisati osobinama njihovog životnog ciklusa i antropogenim utjecajima (Strong i sur., 2008). Karakteristike koje čine osjetljive vrste teško prilagodljivima na promjene u okolišu su slaba pokretljivost, uska vezanost za točno određeni tip staništa, ograničen areal, dugo vrijeme spolnog sazrijevanja, niska plodnost i relativno dug životni vijek (Strong i sur., 2008). Štetni antropogeni utjecaji podrazumijevaju intenzivnu poljoprivredu, povećano korištenje kemijskih gnojiva i pesticida, urbanizaciju, pretjerano iskorištavanje i preoblikovanje vodenih površina, invazivne vrste te klimatske promjene popraćene povećanom učestalošću i intenzitetom suša (Cuttelod i sur., 2011).

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

6.1. Problemi pri uzorkovanju beskralješnjaka u nekim površinskim kopnenim vodama u okviru provedenih monitoring studija u periodu od 2018. do 2023.

Na temelju do sada provedenih monitoring studija Identifikacije opasnih tvari u bioti te praćenje njihovih koncentracija na postajama površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske (2018.-2023.), pokazalo se da je uzorkovanje mekušaca ili rakova bilo moguće provesti u manjem obimu, odnosno beskralješnjake je bilo moguće uzorkovati na manjem broju mjernih postaja od riba. S obzirom na njihovu specifičnu ekologiju, a time i staništa na kojima obitavaju, školjkaše je moguće uzorkovati samo na lokacijama za koja su karakteristična pjeskovito-muljevita dna. Uz to, njihovo uzorkovanje je otežano i zbog činjenice što su uglavnom ukopani u supstrat te je potreban povećan napor da se uzorkuje dovoljan broj jedinki, a osim toga, na velikom broju odabranih postaja na kojima su školjkaši pronađeni, gustoća njihovih populacija bila je mala. Treba istaknuti i da su školjkaši prepoznati kao „inženjeri ekosustava“ koji obavljaju brojne usluge ekosustava pa je uzorkovanje ove skupine na mjestima sa malom gustoćom populacija bolje izbjeći. Upravo je zbog navedenog provedeno uzorkovanje i druge skupine beskralješnjaka, rakušaca, na dodatnih sedam postaja kako bi ispitali njihovu primjenu kao indikatorskih organizama za mjerenje fluorantena i benzo(a)pirena. Međutim, i rakušce možemo naći samo u čistim vodama bogatim kisikom te je također ograničen broj staništa na kojima ih možemo uzorkovati.

Poznato je da su obje skupine, i školjkaši i rakušci osjetljivi na zagađenje te upravo staništa koja su pod jačim antropogenim utjecajem nisu prikladna za njihovo uzorkovanje. Osim toga, jedinke rakušaca su vrlo sitne i javlja se problem prikupljanja dovoljne količine uzoraka za analize. Načelno, rakušci su se pokazali prikladnim organizmima za određivanje akumulacije PAH-ova u bioti, ali treba napomenuti da je provedba monitoringa otežana iz gore navedenih razloga. Mogla bi se također ispitati primjena alternativnih indikatorskih organizama iz skupine beskralješnjaka, npr. slatkovodnih puževa. U švedskoj studiji iz 2015. godine slatkovodni puževi iz porodice Lymnaeidae su se pokazali pogodni za monitoring PAH-ova (Karlsson i sur., 2015). Jedna od vrsta koja bi bila pogodna za uzorkovanje u Hrvatskoj je *Holandriana holandrii*. Ovaj slatkovodni puž je u Hrvatskoj široko rasprostranjen, ima veliku gustoću populacija, prepoznat je kao dobar indikator organskog onečišćenja (Moog, 2002), a može se koristiti i kao biomarker oksidativnog stresa u okolišu (Vranković i sur., 2012). Popis porodica i vrsta slatkovodnih puževa koji se potencijalno mogu koristiti kao zamjena za školjkaše naveden je u gornjem tekstu.

7. ZAKLJUČAK

U opisanoj metodologiji za provođenje monitoringa elemenata kemijskog stanja u bioti površinskih kopnenih voda navedene su preporuke za izbor indikatorskih organizama i provođenje metodologije uzorkovanja vodenih organizama za analizu prioriternih tvari u skladu s Uredbom. Predstavljani su ciljevi i namjena ocjene kemijskog stanja voda na osnovu mjerenja koncentracija prioriternih tvari u bioti, kao i izbor organizama, njihova

ugroženost, zaštita i ekologija u pojedinim kopnenim površinskim vodama Republike Hrvatske.

Izbor vrste organizama u kojima se provode analize prioriternih tvari temelji se na činjenici da je većina od 11 prioriternih tvari za koje su definirane SKVO za biotu podložna biomagnifikaciji te se one analiziraju u ribama, kao organizmima na višem trofičkom nivou. Izuzetak su PAH-ovi (poliaromatski ugljikovodici), poput fluorantena i benzo(a)pirena, koji se određuju u beskralježnjacima, odnosno u organizmima na nižem trofičkom nivou (rakovi ili školjkaši). Analiza u ribama predviđena je u dvije različite vrste tkiva, ovisno radi li se o zaštiti od sekundarnog trovanja (cijela riba) ili zaštiti ljudskog zdravlja (mišićno tkivo ribe) te se heksaklorobutadien, živa i njezini spojevi, dikofol i heksabromociklododekan mjere u cijeloj ribi, a bromirani difenileteri, heksaklorbenzen, perfluoroktansulfonska kiselina, dioksini i spojevi poput dioksina, heptaklor i heptaklorepoksid se mjere u mišiću ribe. Bioakumulacija lipofilnih prioriternih tvari u bioti jako ovisi o njihovom sadržaju masti (lipida) te je za potpuniju interpretaciju rezultata jako važno poznavati udio masti u analiziranim uzorcima, te se mjere dodatno i lipidi.

U preporukama za provođenja monitoringa biote navedene su i smjernice za osmišljavanje programa uzorkovanja, odabira vrste monitoringa (pasivni ili aktivni biomonitoring) te obrade i prikaza rezultata, uključujući normalizaciju na sadržaj masti i suhe tvari te utjecaj trofičkog nivoa na ocjenu sukladnosti sa $SKVO_{biota}$. Poželjno je mjeriti koncentracije prioriternih tvari u ribama koje su na $TL = 3,5 - 4,5$ za koje su definirani $SKVO_{biota}$. Preporuča se za korištene vrste riba prikupiti podatke o trofičkom nivou na kojem se nalaze, ili iz dostupnih baza podataka (FishBase), ili, što bi bilo poželjnije, koristiti konkretne podatke za te vrste riba. Međutim, sukladno dostupnoj literaturi, ne preporuča se korekcija izmjerenih koncentracija na standardni trofički nivo, jer to može uvesti velike pogreške prilikom ocjene sukladnosti izmjerenih koncentracija sa $SKVO_{biota}$.

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

Navedena metodologija za provođenje monitoringa elemenata kemijskog stanja u bioti površinskih kopnenih voda predstavlja prijedlog na temelju dosadašnjih saznanja i provedenih monitoring studija o reprezentativnim vrstama i njihovoj ekologiji u pojedinim vodnim tijelima.

8. LITERATURA

- Cossa D, Harmelin-Civien M, Mellon-Duval C, Loizeau V, Averty B, Crochet S, Chou L, Cadiou JF (2012) Influences of Bioavailability, Trophic Position, and Growth on Methylmercury in Hakes (*Merluccius merluccius*) from North-western Mediterranean and North-eastern Atlantic. *Environmental Science & Technology* 46, 4885–4893
- Cuttelod A, Seddon M, Neubert E (2011) European Red list of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Direktiva Vijeća 92/43/EEZ (1992) o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore
- Duplić A (2008) Slatkovodne ribe. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 2008
- EC 2000, Direktiva 2000/60/EC Europskog Parlamenta i Vijeća kojom se uspostavlja okvir za djelovanje Zajednice na području politike voda (Okvirna direktiva EU o vodama)
- EC 2008, Direktiva 2008/105/EC Europskog parlamenta i Vijeća o standardima kvalitete okoliša u području vodne politike
- EC 2011, CIS zu ODV, Upute br. 27. Tehnička uputa za uspostavljanje standarda kakvoće okoliša unutar Okvirne direktive o vodama.
- EC 2014a, CIS za ODV, Upute br. 32. Uputa za monitoring biote unutar Okvirne direktive o vodama
- EC 2014b, CIS za ODV, Upute br. 33. Uputa za analitičke metode za monitoring biote unutar Okvirne direktive o vodama
- EFSA 2009, Guidance Document on Risk Assessment of Birds and Mammals. Parma, Italy: European Food Safety Authority (EFSA), 358
- Eljarrat E, Bareclo D (2018) How do measured PBDE and HCB levels in river fish compare to the European Environmental Quality Standards? *Environmental Research* 160, 203-211
- EU 2013, Direktiva 2013/39/EU Europskog parlamenta i Vijeća o izmjeni direktiva 2000/60/EZ i 2008/105/EZ u odnosu na prioritete tvari u području vodne politike
- FAME Consortium (2004) Manual for the application of the European Fish Index – EFI. A fish-based method to assess the ecological status of European rivers in support of the Water Framework Directive. Version 1.1, January 2005
- Glazier DS (2009) Amphipoda. U: Likens GE (ur.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Oxford, Elsevier, vol. 2, 89-115

- Glöer P (2002) Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas, Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands, 73 Teil, Conchbooks, Hackenheim.
- Habdija I, Primc Habdija B, Radanović I, Špoljar M, Matonićkin Kepčija R, Vujčić Karlo S, Miliša M, Ostojić A, Sertić Perić M (2011) Protista – Protozoa i Metazoa-Invertebrata. Strukture i funkcije. Alfa, Zagreb.
- HELCOM, 2017. Core indicator report, Polybrominated diphenyl ethers (PBDE), July 2017. <http://www.fishbase.org/search.php>
- ISO, 2011, ISO 5667-23:2011, Water quality — Sampling — Part 23: Guidance on passive sampling in surface waters.
- Identifikacija opasnih tvari u bioti i sedimentu te praćenje njihovih koncentracija u jednogodišnjem razdoblju na trend postajama površinskih kopnenih voda; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Prirodoslovno - matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Nacionalni laboratorij za zdravlje, okoliš i hranu, Maribor, Slovenija, 2021.
- Identifikacija opasnih tvari u bioti i sedimentu te praćenje njihovih koncentracija na trend postajama površinskih kopnenih voda u periodu od rujna 2020. do rujna 2021.; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Prirodoslovno - matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Nacionalni laboratorij za zdravlje, okoliš i hranu, Maribor, Slovenija, 2021.
- Identifikacija opasnih tvari u bioti i sedimentu te praćenje njihovih koncentracija u 2021. godini na trend postajama površinskih kopnenih voda; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Prirodoslovno - matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Nacionalni laboratorij za zdravlje, okoliš i hranu, Maribor, Slovenija, 2023.
- Identifikacija opasnih tvari u bioti te praćenje njihovih koncentracija u 2022. godini na postajama površinskih kopnenih voda; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Prirodoslovno - matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Eurofins Croatiakontrola, 2024.
- Sustavno ispitivanje opasnih tvari u bioti na postajama površinskih kopnenih voda, Izvještaj za 2023. godinu; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Prirodoslovno - matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Eurofins Croatiakontrola, Eurofins GfA Lab Service GmbH, 2024.
- Karlsson M (2015) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater snails of family Lymanidae from Patholmsviken. Project in Chemistry: 15 HP, Örebro University, 68.
- Killeen I, Aldridge D, Oliver G (2004) Freshwater Bivalves of Britain and Ireland. FSC, AIDGAP Occasional Publication, 82.

- Kottelat M, Freyhof J (1972) Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 646
- Lajtner J, Crnčan P (2011) Distribution of the invasive bivalve *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Croatia. Aquatic invasions 6, Supplement 1: S119–S124
- Lopes Lima M, Geist J, Egg S *et al.* (2024): Integrative phylogenetic, phylogeographic and morphological characterisation of the *Unio crassus* species complex reveals cryptic diversity with important conservation implications. Molecular Phylogenetics and Evolution 195. 08046. doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108046
- Lydeard C, Robert HC, Winston FP, Arthur EB, Philippe B, Stephanie AC, Kevin SC, Terrence JF, Olivier G, Dai GH, Robert H, Kathryn EP, Barry R, Mary S, Ellen ES, Andfred GT (2004) The Global Decline of Nonmarine Mollusks. BioScience 54(4) 321-330 2004
- Matoničkin I, Habdija I, Primc Habdija B (1998) Beskralješnjaci – biologija nižih avertebrata. Školska knjiga, Zagreb, 593-620
- Moog O (2002) Fauna Aquatica Austriaca, 2nd Edition Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Vienna.
- Mrakovčić M, Brigić A, Buj I, Čaleta M, Mustafić P, Zanella D, 2006 Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb, 2006
- Narodne novine, 144/13: Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama
- Narodne novine 96/2019, Uredba o standardu kakvoće voda
- Narodne novine 20/2023, Uredba o izmjenama i dopunama Uredbe o standardu kakvoće voda
- Narodne novine 50/2023, Ispravak Uredbe o izmjenama i dopunama Uredbe o standardu kakvoće voda
- OSPAR komisija (2016) Mercury assessment in the marine environment. Assessment criteria comparison (EAC/EQS) for mercury
- Pfleger V, Chatfield J (1988) A Guide to Snails of Britain and Europe. 1st. Eng. Ed. Pub. Hamlyn, UK
- Rätz H-J, Lloret J (2003) Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. Fisheries Research 60, 369–380
- Rezultati provedbe preliminarnog monitoringa prioriternih tvari u bioti površinskih kopnenih voda; Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet

Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje i hranu, Maribor, Slovenija, 2018. Smedes F, Bakker D, de Weert J (2010) The use of passive sampling in WFD monitoring. Deltares, 2010.

Smedes F, Booij K (2012) Guidelines for passive sampling of hydrophobic contaminants in water using silicone rubber samplers. ICES techniques in marine Environmental Sciences, No. 52

Strong EE, Gargominy O, Ponder WF, Bouchet P (2008) Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 149–166

Väinölä R, Witt JDS, Grabowski M, Bradbury JH, Jazdzewski K, Sket B (2008) Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. Freshwater animal diversity assessment. *Hydrobiologia* 595, 241-255

Vignati DAL, Polesello S, Bettinetti R, Bank MS (2013) Mercury environmental quality standard for biota in Europe: Opportunities and challenges. *Integrated Environmental Assessment and Management* 9, 167-168

Vranković J, Labus-Blagojevic S, Csanyi B, Makovinska J, Cvetkovic O, Gacic Z, Paunovic M (2012) Antioxidant enzymes and GST activity in natural populations of *Holandriana holandrii* from the Bosna River. *Turkish Journal of Biology* 36, 477-485

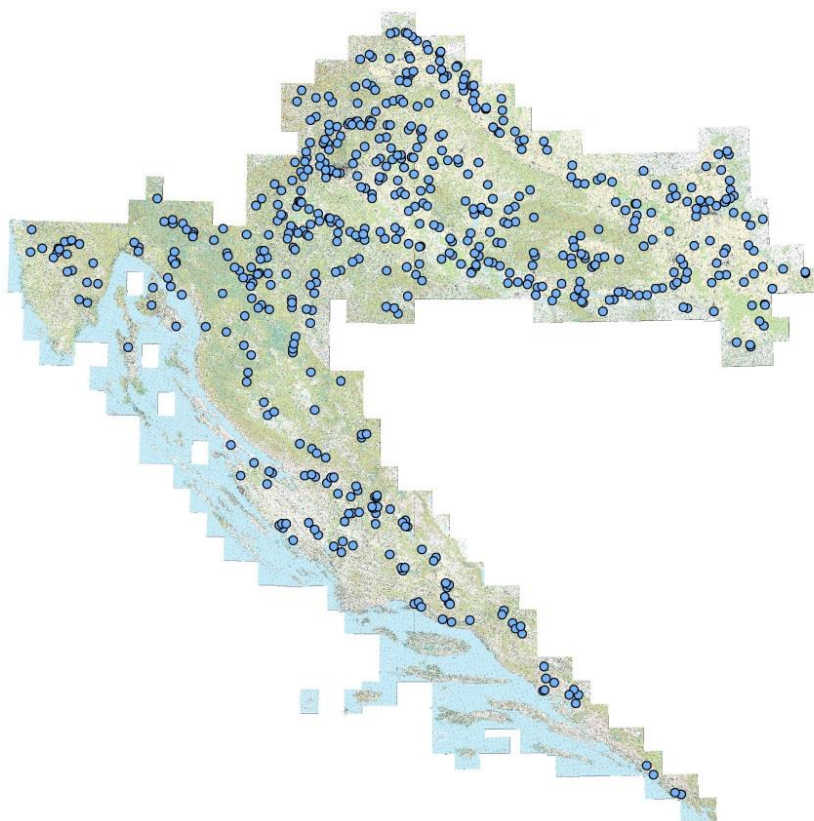
Živković I, Šolić M, Kotnik J, Žižek S, Horvat M (2017). The abundance and speciation of mercury in the Adriatic plankton, bivalves and fish – a review. *Acta Adriatica* 58(3), 391-420

9. PRILOZI

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

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

Reprezentativne vrste riba za sva vodna tijela rijeka površine sliva veće od 10 km² i jezera površine veće od 0,5 km² u Republici Hrvatskoj prikazane su na karti Republike Hrvatske koja je priređena u HRTS96 projekciji (Slika 9.1.).



Slika 9.1. Karta u HRTS96 projekciji s upisanim lokacijama na kojima su predložene reprezentativne vrste riba za sva vodna tijela rijeka površine sliva veće od 10 km² i jezera površine veće od 0,5 km² u Republici Hrvatskoj (dostupna u Hrvatskim vodama)

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

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

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

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

Na temelju dosadašnjih monitoring studija Identifikacije opasnih tvari u bioti te praćenje njihovih koncentracija na postajama površinskih kopnenih voda Republike Hrvatske provedenih u periodu 2018.-2023. godine, uzorkovanje reprezentativnih vrsta riba je uglavnom bilo moguće provesti u dovoljnom broju za analize. Izuzetak su pojedine postaje gdje zbog onečišćenja ili specifičnosti staništa nije moguće očekivati da obitavaju ribe te na tim postajama nije provedeno uzorkovanje, što je izdvojeno u Tablici 9.1.

Tablica 9.1. Popis postaja na kojima nije moguće provesti uzorkovanje riba

Šifra	Naziv postaje	Razlog
10440	Lufinja, Karasno (Sičice)	nema riba zbog antropogenog utjecaja -kanal koji presušuje
10441	Mačkovac - Lufinja, Dolina	nema riba zbog antropogenog utjecaja
12302	Brežnica, prije utoka u Biđ	nema riba zbog antropogenog utjecaja
12514	Kaznica (kanal Ribnjak), Piškorevci	nema riba zbog antropogenog utjecaja
13235	Velika rijeka, Kutjevo (Rikino vrelo)	prirodno nema riba - jako malo vode
13504	Vučjak	nema riba zbog antropogenog utjecaja - presušuje
15224	Tomašica, Tomašica	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15231	Toplica, nizvodno od Daruvara	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15241	Kutinica, prije utoka u Ilovu	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15254	Šovarnica, V. Zdenci	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15381	Črnec, G. Dubovec	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15385	Ribnjača, Pobjenik	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije

Šifra	Naziv postaje	Razlog
15389	Kamešnica, Kamešnica	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
15450	Gračenica, Donja Gračenica	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15454	Liplenica, Šušnjari	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
15490	Kovačević, Roždanik	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15492	Novska, Bročice	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
15493	Brestača	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
15589	Zelina, Biškupec Zelinski	nema riba zbog antropogenog utjecaja -kanal
16339	Slunjčica (uzvodno od crpilišta Slunj)	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
16453	Mrežnica Juzbašići	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
16560	Žumberačka reka, uz cestu prema Japetiću	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
16585	Sušica, na cesti Vrbovsko – Moravice	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
21122	Sirova Katalena, cesta Đurđevac – Kloštar Podravski	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
21201	Crni fok, Čepinska obilaznica	nema riba zbog antropogenog utjecaja
21207	Kanal Serečin, južno od Darde	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
21226	Strug, Gorica Valpovačka	nema riba zbog antropogenog utjecaja - presušuje
30017	Trbuhovica	prirodno nema riba - izvor
30028	Gerovčica, gornji tok	prirodno nema riba - gornji tok
30045	Sijaset-Kolan, Sv. Križ	prirodno nema riba - presušuje
30046	Akumulacija Brlog, Gusić polje	nema riba zbog antropogenog utjecaja
30325	Krbava, Udbina	prirodno nema riba - presušuje
31009	Krvar, most na cesti Motovun - Pazin	prirodno nema riba - presušuje
31023	Mirna, Dionizijev most	prirodno nema riba - slano
31025	Obuhvatni kanal Krapanj, most u naselju Raša	prirodno nema riba - slano
31071	Pazinčica, ponor	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
31082	Boljunčica, nizvodno od mjesta Brus	prirodno nema riba - presušuje
40140	Pritok Cetine uzvodno od Vinalića	prirodno nema riba - presušuje
40198	Kobilica, Kusac	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije

Šifra	Naziv postaje	Razlog
40200	Zrmanja, Butiga	prirodno nema riba - presušuje
40214	Rivina Jaruga, Pavasovići	nema riba zbog antropogenog utjecaja - presušuje
40221	Vodotok Bokanjac, prije ulaska u tunel	nema riba zbog antropogenog utjecaja - kanal koji presušuje
40224	Otuča, nizvodno od Gračaca	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje
40315	Jaruga, Benkovac	prirodno nema riba - presušuje
40317	Lateralni kanal prije utoka u Vransko jezero	nema riba zbog antropogenog utjecaja
40318	Bašćica, uzvodno od Posedarja	prirodno nema riba - presušuje
40319	Macavarina Draga	prirodno nema dovoljno riba u skladu sa zahtjevima Metodologije
40418S	Krčić, izvorište	prirodno nema riba - presušuje
40426	Suvova, Donje Postinje	prirodno nema riba - presušuje
40432	Vrba, Ojdanići	prirodno nema riba - presušuje
40433	Vrba, nizvodno od Keruma	prirodno nema riba - presušuje
40702	Taranta, uzvodno od Srebrenog	prirodno nema riba - presušuje
51160	Potok Vranić	nema riba zbog antropogenog utjecaja - onečišćenje

9.1.2. Način uzorkovanja riba

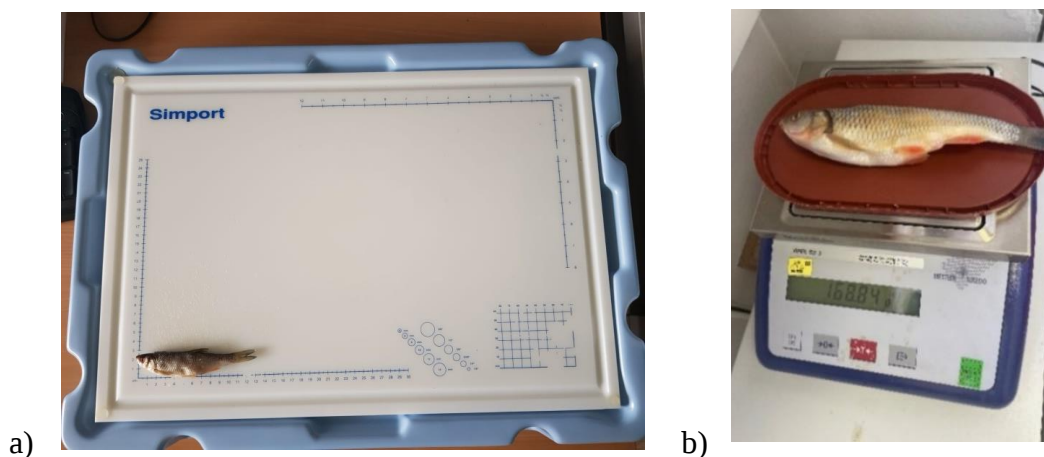
Elektroribolov predstavlja univerzalnu standardnu metodu uzorkovanja na rijekama. Ova metoda uzorkovanja omogućuje najbolju procjenu gustoće populacija, bogatstva vrsta i međusobnih odnosa zabilježenih vrsta riba, a predstavlja ujedno i najmanje štetan način ribolova u usporedbi s drugim metodama.

Za potrebe ove studije elektroagregatom je lovljeno s obale ili iz čamca. Na većim rijekama gdje je zbog dubine (>0,7 m) i raznolikosti staništa nemoguće obaviti kvalitetno uzorkovanje s obale ni hodanjem po rijeci, korišten je poseban čamac za elektroribolov. U dubljim vodama elektroribolov nije toliko efikasna metoda jer ribe imaju veću mogućnost izbjegavanja električnog polja. U spomenutim slučajevima elektroagregat mora imati veću snagu (preporuča se najmanje 2,5 kW za lov s obale i najmanje 5 kW za lov iz čamca) i mora omogućavati lov pulsirajućom strujom. Nužno je koristiti istosmjernu struju (sa ili bez mogućnosti pulsiranja) jer je najmanje štetna za ribe, a daje najbolje rezultate dok se izmjenična struja ne koristi. Primjerice, u ovom istraživanju korišten je ribolovni elektroagregat snage 7,5 kW na svim postajama osim na postajama na rijekama Savi i Dunavu, gdje je, zbog veličine samog vodotoka, korišten ribolovni elektroagregat snage 11 kW. Lovljeno je jednom anodom promjera obruča od 50 cm na dršku od stakloplastike dužine 2,5 m iz gumenog čamca prilagođenog za elektroribolov ili hodajući uz obalu ako je dubina vodotoka bila manja od 70 cm. Na vrlo velikim rijekama (Savi i Dunavu) koristi se sistem od četiri anode koje vise s vrha izbočene konstrukcije i zatvaraju električno polje

širine 2 m, a dva istraživača su sakupljala ošamućenu ribu i dostavljali ju dijelu tima na brojanje i determinaciju. Ribolov se obavljao nizvodno kretanjem čamca uzduž obale na način da su u najvećoj mjeri pokrivena sva postojeća staništa, a posebno mjesta gdje se ribe mogu sakriti. Kada se sakupi dovoljno uzoraka, riba se sprema na hladno i prosljeđuje na daljnju analizu.

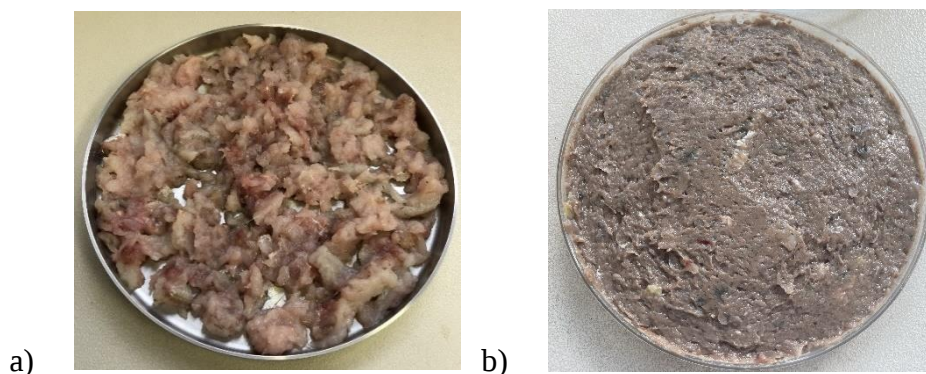
9.1.3. Obrada i priprema uzoraka riba za analizu

Vrsta i količina tkiva riba koja je potrebna za analizu prioriternih tvari u ribama definirani su ciljevima zaštite za te prioritne tvari, zadanim vrijednostima $SKVO_{biota}$, te osjetljivošću analitičkih metoda koje se koriste. Bioakumulacija lipofilnih prioriternih tvari u bioti jako ovisi o njihovom sadržaju masti (lipida) te je za potpuniju interpretaciju rezultata jako važno poznavati i udio lipida u analiziranim uzorcima. Od devet prioriternih tvari koje se analiziraju u ribama, uzimajući u obzir različite ciljeve zaštite, pet se analizira u mišiću ribe (cilj - zaštita ljudskog zdravlja), a četiri u cijeloj ribi (cilj - zaštita od sekundarnog trovanja) (Tablica 2.2.), dok se lipidi, koji se mjere u svrhu procjene ovisnosti bioakumulacije lipofilnih prioriternih tvari o udjelu lipida, određuju i u mišiću i cijeloj ribi. Minimalne odvage mokre mase mišića i cijele ribe koje su potrebne za analizu pojedinih prioriternih tvari navedene su u Tablici 9.2. Za analizu svih prioriternih tvari koje se određuju u ribama potrebno je minimalno 245 g mokre mase mišića riba (ili 800 g cijele ribe prije uklanjanja mišića) i 175 g mokre težine cijele ribe, dakle ukupno oko 1000 g mokre težine riba za analizu svih devet prioriternih tvari. Treba napomenuti da analitička metoda koja se koristi značajno utječe na količinu tvari koja je potrebna za analizu, tako da se količine tkiva potrebne za analizu trebaju uskladiti sa zahtjevima analitičkih metoda koje se koriste za provođenje svakog monitoringa. Rukovanje s uzorcima riba obavlja se u zaštitnim, plastičnim rukavicama kako bi se spriječila kontaminacija. Nakon uzorkovanja ribe je potrebno odmah zamrznuti te pohraniti u plastičnim vrećicama na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do obrade u laboratoriju. Prije obrade svakoj ribi treba odrediti ukupnu dužinu (ihtiometar) (Slika 9.2. a) i masu (laboratorijska vaga) (Slika 9.2. b), kako bi se mogla procijeniti njihova starost i kondicijski indeks.



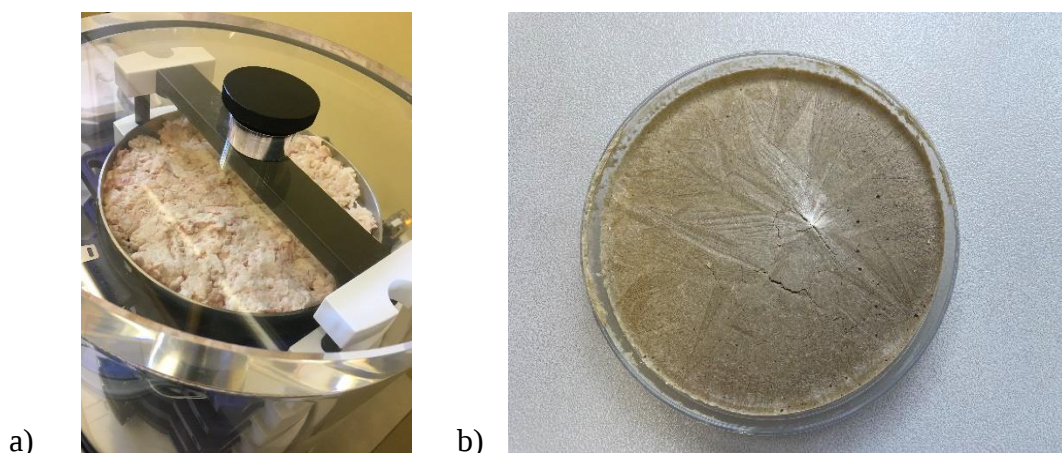
Slika 9.2. Određivanje osnovnih biometrijskih čimbenika riba: a) ukupne dužine na ihtiometru; b) ukupne mase na laboratorijskoj vagi

Odvajanje mišića iz uzorka cijele ribe treba provesti na poluodmrznutim uzorcima, kako bi se izbjeglo kompletno otapanje tkiva i eventualno zagađenje mišića utrobnim organima ribe. Mišiće je potrebno odvojiti od ostatka tijela ribe (glava, ljuske, koža i utrobni organi) te za odvagu potrebnu za analize prioriternih tvari objediniti mišiće većeg broja riba, koji se dodatno usitne škarama (Slika 9.3. a). Isto tako, za analize prioriternih tvari u cijeloj ribi se za potrebnu odvagu objedini određeni broj jedinki u zajednički uzorak, koji je potrebno dodatno samljeti štapnim mikserom/sjeckalicom kako bi se i tvrdi dijelovi (glava, kosti) usitnili (Slika 9.3. b).



Slika 9.3. Priređeni uzorci riba nakon seciranja: a) mišić riba usitnjen škarama; b) cijela riba usitnjena štapnim mikserom/sjeckalicom

Vrijednosti za $SKVO_{biota}$ su izražene na mokru težinu, tako da je potrebno izmjerene vrijednosti izraziti na mokru težinu uzorka. Međutim zbog lakšeg transporta uzoraka do mjesta analize, preporuča se da se nakon seciranja i usitnjavanja uzorci liofiliziraju. Za svaki uzorak mora se odrediti suha masa kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru masu i napraviti ocjena sukladnosti sa $SKVO_{biota}$. Liofilizirane uzorke mišića riba (Slika 9.4. a) i cijele ribe (Slika 9.4. b) potrebno je čuvati na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiza.



Slika 9.4. Liofilizirani uzorak: a) mišića ribe; b) cijele ribe

Faktor preračuna s mokre na suhu masu za cijelu ribu je oko četiri (tkivo riba sadrži prosječno 25 % suhe tvari), a za mišićno tkivo riba pet (mišićno tkivo sadrži prosječno 20 % suhe tvari), tako da je nakon liofiliziranja potrebno ukupno za sve analize oko 50 g suhe mase za mišić i 45 g suhe mase za cijelu ribu.

Tablica 9.2. Količina uzorka potrebna za analizu pojedinih prioriternih tvari u cijelim ribama i u mišiću riba (podaci iz monitoring studija provedenih 2018.-2023. godine).

Prioritetna tvar	Masa mokrog uzorka potrebna za analizu
Analize koje se rade u mišiću riba (cilj zaštita ljudskog zdravlja)	
Bromirani difenileteri	40 g
Heksaklorbenzen Heptaklor i heptaklorepoksid	30 g
PFOS	50 g
Dioksini	50 g
Poliklorirani bifenili ukupni	50 g
(dodatno za udio lipida zbog lipofilnih prioriternih tvari)	25 g
Ukupno za analizu tvari u mišiću riba	245 g (800 g neočišćene ribe)
Analize koje se rade u cijeloj ribi (cilj zaštita od sekundarnog trovanja)	
Hg	30 g
Heksabromociklododekan (HBCDD)	30 g
Heksaklorobutadien	60 g
Dikofol	30 g
(dodatno za udio lipida zbog lipofilnih prioriternih tvari)	25
Ukupno za analizu tvari u cijeloj ribi	175 g

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

Prilog 9.2. Naputak za uzorkovanje i pripremu uzoraka beskralješnjaka za provođenje monitoringa u površinskim kopnenim vodama

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

9.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka školjkaša

Potrebno je sakupiti 5-10 jedinki školjkaša u rasponu dužine 5-10 cm i pohraniti ih u plastičnu vrećicu. Ako se uzorci školjkaša obrađuju unutar 24 sata od uzorkovanja čuvaju se na hladnom mjestu na 4 °C. Ako je period prije obrade duži, školjkaše je potrebno odmah nakon uzorkovanja zamrznuti i do obrade čuvati na temperaturi od -20 °C. Prije obrade potrebno je izmjeriti dužinu (Slika 9.5. a) i masu školjkaša (Slika 9.5. b) te zatim odvojeno masu mekog tkiva kako bi se mogla odrediti mokra masa za analize. Za analizu se koriste ukupna meka tkiva.



Slika 9.5. Određivanje osnovnih biometrijskih čimbenika školjkaša: a) ukupne dužine pomičnim mjerilom; b) ukupne mase na laboratorijskoj vagi

Preporučena vrsta školjkaša, potreban broj jedinki i njihova veličina, optimalan period uzorkovanja i količina tkiva za analizu su prikazani u Tablici 9.3.

Tablica 9.3. Preporučena vrsta školjkaša za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučeni period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

Vrsta školjkaša	Potreban broj jedinki	Dužina /cm	Period uzorkovanja	Potrebna masa mokrog tkiva /g
Vrste iz porodice Unionidae	5-10	6-10	po izbacivanju vlastitih glohidija	90-100

Odvage školjkaša potrebne za analize fluorantena i benzo(a)pirena su 90-100 g mokre mase tkiva (Tablica 9.3.). Cijelo meko tkivo potrebnog broja jedinki školjkaša objedinjenog za ovu odvagu se usitni u štapnom mikseru/sjeckalici, pohrani na -80 °C te zatim liofilizira. Liofilizirane uzorke potrebno je čuvati na temperaturi od -20 °C. Za svaki uzorak potrebno je odrediti suhu masu, kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru težinu i ocijeniti usklađenost sa SKVO_{biota}.

Faktor preračuna s mokre na suhu masu za školjkaše je oko 10 (tkivo sadrži prosječno 10 % suhe tvari), tako da se nakon liofiliziranja dobije oko 9-10 g suhe mase jedinki školjkaša za analizu PAH-ova i dodatno za određivanje udjela lipida zbog lipofilnih prioriternih tvari (Tablica 9.4.).

Tablica 9.4. Količina uzorka potrebna za analizu fluorantena i benzo(a)pirena u školjkašima (podaci iz monitoring studija provedenih 2018.-2023.)

Prioritetna tvar	Masa mokrog uzorka potrebna za analizu
Analize koje se provode u školjkašima	
Fluorantena i benzo(a)pirena	40 g
(dodatno za udio lipida zbog lipofilnih prioriternih tvari)	50 g
Ukupno za analizu tvari u školjkašima	90 g (zbog velikog udjela vode uzeti oko 100 g mekog tkiva školjkaša)

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

9.2.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka puževa

Potrebno je sakupiti određeni broj jedinki puževa, čiji ukupan broj ovisi o veličini jedinki, a mora odgovarati mokroj masi mekog tkiva od oko 90 g koja je potrebna za analize (Tablica 9.5.) Puževe je potrebno pohraniti u plastičnu vrećicu, na kojoj je označena vrsta puževa i lokacija gdje su prikupljeni. Ako se uzorci puževa obrađuju unutar 24 sata od uzorkovanja čuvaju se na temperaturi od 4 °C. Ako je period prije obrade duži, puževe je potrebno odmah nakon uzorkovanja zamrznuti i do obrade čuvati na temperaturi od -20 °C. Za analizu se koriste ukupna meka tkiva, koja je potrebno odvojiti od kućice. Odvajanje mekog tkiva se provodi mrvljenjem kućice, što je najbolje provesti u škripcu jer omogućava kontrolirano mrvljenje te se kućica u potpunosti ne rapadne i moguće ju je odvojiti od mekog tkiva bez

ostataka sitnih raspadnutih dijelova kućice. Odvojeno meko tkivo puževa se stavi u posudicu (Slika 9.6.) te se izmjeri ukupna masa puževa za analize i zabilježi točan broj jedinki uzetih za analize.



Slika 9.6. Odvojeno meko tkivo puževa za daljnju obradu

Preporučena vrsta puževa, potreban broj jedinki i njihova veličina, optimalan period uzorkovanja i količina tkiva za analizu su prikazani u Tablici 9.5.

Tablica 9.5. Preporučena vrsta puževa za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučeni period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

Vrsta puževa	Potreban broj jedinki	Period uzorkovanja	Potrebna masa mokrog tkiva /g
Vrste iz porodica Amphimelaniidae, Bithyniidae, Lymnaeidae, Melanopsidae, Neritidae, Physidae, Planorbidae i Viviparidae	10-30 (broj ovisi o vrsti puža i može dosta varirati)	Prisutni tijekom cijele godine, te ne postoji preporučeni period s obzirom na fiziologiju rganizma	90

Cijelo meko tkivo jedinki puževa koje odgovara odvagama za analizu prioritentih tvari (Tablica 9.6., ukupna odvaga mokre mase tkiva oko 90 g) se usitni škarama i po potrebi štapnim mikserom/sjeckalicom i pohrani na -80 °C do postupka liofilizacije. Liofilizacija traje oko 25 sati, a liofilizirane uzorke potrebno je čuvati na temperaturi od -20 °C (Slika 9.7.). Krajnji je postupak kriogeno mljevenje, koji omogućava da se uzorak potpuno usitni i bude homogen, te je kao takav spreman za provođenje analiza prioritentih tvari.



Slika 9.7. Liofilizirano meko tkivo puževa za daljnju obradu

Za svaki uzorak potrebno je odrediti suhu masu, kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru težinu i ocijeniti usklađenost sa SKVO_{biota}. Faktor preračuna s mokre na suhu masu za puževe je oko 5 (tkivo sadrži prosječno 20 % suhe tvari), tako da se nakon liofiliziranja dobije oko 8-10 g suhe mase jedinki puževa za analizu PAH-ova i lipida.

Tablica 9.6. Količina uzorka potrebna za analizu fluorantena i benzo(a)pirena u puževima (podaci iz monitoring studija provedenih 2018.-2022.)

Prioritetna tvar	Masa mokrog uzorka potrebna za analizu
Analize koje se provode u puževima	
Fluorantena i benzo(a)pirena	40 g
Lipidi	50 g
Ukupno za analizu tvari u puževima	90 g

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

9.2.3. Uzorkovanje i priprema uzoraka rakušaca

Potrebno je sakupiti oko 400 -700 jedinki rakušaca čija je ukupna mokra masa oko 10-20 g (Slika 9.8.) i pohraniti ih u plastičnu vrećicu.



Slika 9.8. Sakupljanje jedinki rakušaca u svrhu pripreme uzoraka za analize prioriternih tvari

Rakušce je potrebno odmah nakon uzorkovanja zamrznuti i do obrade čuvati na temperaturi od -20 °C. Prije obrade potrebno je izmjeriti točnu masu rakušaca kako bi se odredila mokra masa uzorka za analize prema Tablici 9.7. Za analizu se koriste cijele jedinke rakušaca (uzima se onoliki broj jedinki koliko je potrebno da se dobije odvaga od oko 10-20 g) koje se nakon odvage pohranjuju u posudicu na -80 °C te naknadno liofiliziraju. Nakon liofilizacije, uzorke je potrebno čuvati na temperaturi od -20 °C do provođenja analiza. Za svaki uzorak potrebno je odrediti suhu masu, kako bi se izmjerene koncentracije mogle preračunati na mokru težinu i ocijeniti usklađenost sa SKVO_{biota}.

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

Tablica 9.7. Preporučena vrsta rakušaca za uzorkovanje u površinskim kopnenim vodama, potreban broj jedinki i njihova veličina, preporučeni period uzorkovanja i količina tkiva za analizu.

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