

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer znanstveni

Dora Horvatić

Primjena Lemna-testa u procjeni kvalitete površinskih voda

Diplomski rad

Mentor: Doc. dr. sc. Vesna Peršić

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij **Biologija; smjer znanstveni**
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Primjena Lemna-testa u procjeni kvalitete površinskih voda

Rad je izrađen u: Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Doc. dr. sc. Vesna Peršić

Kratak sažetak diplomskog rada:

Kakvoća vode Odvodnog kanala Karašica u Baranji bila je pod jakim antropogenim utjecajem (poljoprivreda, komunalne otpadne vode), a unos zagađivala u vodotok ovisio je i o sezonskim promjenama klimatskih parametara. Utvrđene značajne promjene u specifičnoj vodljivosti prije i nakon ispusta pokazatelj su ulaska otpadnih voda. Visoke koncentracije enterokoka i vrste *E. coli* ukazuju na svježije fekalno onečišćenje otpadnim vodama, dok je prisutnost specifičnih onečišćujućih tvari (organoklorovi pesticidi, heksaklorcikloheksani te DDT i metaboliti) i metala kao zagađivala u kanalu najviše posljedica ispiranja s poljoprivrednih površina, posebno u jesen. Odabrani parametri u Lemna-testu (prirast i svježina masa biljaka, fotosintetski pigmenti, ukupni topljivi proteini i malondialdehid) dobri su pokazatelji utjecaja zagađivala prisutnih u istraživanoj vodi na *L. minor*. Niske razine hranjivih tvari u vodi, posebno dušika i visoke razine zagađivala uvjetovali su stres u *L. minor* indukcijom lipidne peroksidacije u gotovo svim uzorcima vode Odvodnog kanala. U tim je uvjetima došlo do povećanja omjera Chl_a/b i smanjenja omjera Chl_(a+b)/Car, smanjene koncentracije ukupnih proteina i svježine mase biljaka *L. minor*. Uporabom Lemna-testa na različitim razinama složenosti (morfološke promjene, pigmenti, proteini i lipidna peroksidacija) postignuta je preciznija procjena učinka realnih uzoraka vode iz okoliša.

Broj stranica: 81

Broj slika: 34

Broj tablica: 8

Broj literaturnih navoda: 119

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kakvoća vode, Odvodni kanal Karašica, Lemna-test, *Lemna minor*

Datum obrane: 03. svibnja 2018. godine

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Melita Mihaljević, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Goran Palijan, član
3. Doc. dr. sc. Vesna Peršić, član, mentor
4. Doc. dr. sc. Rosemary Vuković, zamjena člana

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u sveučilišnom i nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Master thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

Application of Lemna-test in the assessment of surface water quality

Dora Horvatić

Thesis performed at: Laboratory of Plant Ecophysiology, Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**Supervisor:** Vesna Peršić, PhD, assistant profesor**Short abstract:** water quality, the Karašica drainage channel, Lemna-test, *Lemna minor*

Water quality in the Karašica drainage channel in Baranja is under a strong influence of anthropogenic sources (agriculture and municipal wastewaters), and the input of polluted waters into this watercourse also depends on seasonal changes in climate parameters. Significant changes in specific conductivity before and after the discharge site were indications of wastewater inflow. High concentrations of enterococci and *E. coli* were good indicators of recent faecal contamination with wastewaters, while the presence of specific pollutants (organochlorine pesticides, hexachlorocyclohexanes, and DDT and its metabolites), as well as metals, evidently derived from agricultural run-off, especially in the autumn. Selected parameters in the Lemna-test (growth rate and yield, photosynthetic pigments, total soluble proteins and malondialdehyde) proved to be useful indicators of the influence of present pollutants in the investigated waters on *L. minor*. Low levels of nutrients in the water, especially nitrogen and high levels of specific contaminants, have caused growth inhibition of *L. minor* associated with enhanced lipid peroxidation, as well as decreased Chl_a/b and Chl_(a+b)/Car and reduced protein concentrations in almost all water samples of the drainage channel. A more accurate assessment of water quality was achieved by using Lemna test with relevant structural or functional endpoints (morphological changes, pigments, proteins and lipid peroxidation) and by considering time-varying exposure of different sources of pollution.

Number of pages: 81**Number of figures:** 34**Number of tables:** 8**Number of references:** 119**Original in:** Croatian**Keywords:** water quality, the Karašica drainage channel, Lemna-test, *Lemna minor***Date of the thesis defence:** 3rd May 2018**Reviewers:**

1. Melita Mihaljević, PhD, associate professor, chair
2. Goran Palijan, PhD, assistant profesor, member
3. Vesna Peršić, PhD, assistant profesor, supervisor
4. Rosemary Vuković, PhD, assistant profesor, member

Thesis deposited: on the web site of the Department of Biology and in Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library.

Od srca se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Vesni Peršić na beskonačnom strpljenju i podršci, posvećenom vremenu, svim stručnim savjetima i uputama, a posebno na prenesenom znanju i stečenom iskustvu tijekom cjelokupne izrade diplomskog rada.

Također se zahvaljujem svim članovima Laboratorija za ekofiziologiju biljaka na susretljivosti, razumijevanju i iskrenoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriju.

Veliko hvala svim mojim dragim prijateljima koji su mi svojim prisutstvom, podrškom i nesebičnim prijateljstvom uvelike olakšali i uljepšali studij. Hvala i kolegicama Jeleni i Tei te kolegi Josipu na tehničkoj pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Naposljetku, najviše se zahvaljujem mojoj obitelji, a posebno svojoj majci na bezuvjetnoj ljubavi i osloncu te pruženoj potpori tijekom svih godina školovanja.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.2. Pokazatelji onečišćenja.....	2
1.2.1. Zakiseljenost, alkalitet-m, specifična vodljivost vode	2
1.2.2. Ukupni organski ugljik, biološka i kemijska potrošnja kisika	4
1.2.3. Hranjive tvari.....	4
1.2.4. Mikrobiološki pokazatelji onečišćenja.....	5
1.2.5. Specifične onečišćujuće tvari	6
1.3. Biotestovi.....	8
1.3.1. Biljni biotestovi	9
1.3.2. Lemna-test.....	9
1.3.3. Vodena leća (<i>L. minor</i> L.) kao testni organizam.....	10
1.3.4. Pokazatelji toksičnosti u Lemna-testu.....	11
1.3.4.1. Fotosintetski pigmenti	12
1.3.4.2. Ukupni topljivi proteini	12
1.3.4.3. Lipidna peroksidacija	13
1.3.5. Prednosti i nedostaci Lemna-testa.....	14
1.4. Cilj rada	15
2. Materijali i metode	16
2.1. Područje istraživanja.....	16
2.2. Uzimanje uzoraka	17
2.3. Mjerenje fizikalno-kemijskih svojstava vode.....	20
2.4. Mikrobiološka analiza	20
2.5. Određivanje specifičnih onečišćujućih tvari.....	21
2.6. Lemna test	22
2.6.1. Kultura vodene leće (<i>L. minor</i> L.)	22
2.6.2. Određivanje prirasta broja i svježe mase biljaka	23
2.6.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	24
2.6.4. Određivanje koncentracije proteina.....	25
2.6.5. Određivanje malondialdehida.....	25
2.7. Statistička obrada podataka	26
3. Rezultati	27

3.1.	Fizikalno – kemijska svojstva vode i zraka	27
3.1.1.	Ukupna mjesečna količina oborina i temperatura zraka	27
3.1.2.	Temperatura vode i režim kisika Odvodnog kanala Karašica.....	28
3.1.3.	pH, alkalitet-m i specifična vodljivost vode Odvodnog kanala Karašica	29
3.1.4.	Koncentracija ukupnog organskog ugljika u vodi Odvodnog kanala Karašica .	31
3.1.5.	Biološka i kemijska potrošnja kisika u vodi Odvodnog kanala Karašica	32
3.1.6.	Koncentracija dušika i fosfora.....	33
3.1.7.	Koncentracija klorida i sulfata	37
3.1.8.	Koncentracija natrija, kalija, kalcija i magnezija	38
3.2.	Mikrobiološki pokazatelji onečišćenja u vodi Odvodnog kanala Karašica.....	41
3.3.	Specifične onečišćujuće tvari u vodi Odvodnog kanala Karašica	42
3.3.1.	Koncentracija metala (bakar, željezo, cink, olovo i kadmij).....	42
3.3.2.	DDT i metaboliti te ciklodienski pesticidi	43
3.4.	Lemna test	47
3.4.1.	Prirast broja biljaka	47
3.4.2.	Svježa masa biljaka	49
3.4.3.	Koncentracija klorofila <i>a</i> (Chl _a), klorofila <i>b</i> (Chl _b) i karotenoida (Car).....	51
3.4.4.	Koncentracija proteina	57
3.4.5.	Koncentracija malondialdehida (MDA).....	58
4.	Rasprava.....	61
5.	Zaključci.....	72
6.	LITERATURA	73

1. Uvod

1.1. Kvaliteta vode

„Voda nije komercijalni proizvod kao bilo koji drugi, nego baština koja mora biti zaštićena, branjena i tretirana kao takva“. To je prva rečenica Okvirne direktive o vodama (European Commission, 2000) koja jasno naglašava važnost očuvanja kvalitete vode i razvijanja integrirane politike o vodama uzimajući u obzir krhkost vodenih ekosustava. Kvaliteta voda je vrlo promjenjiva jer ovisi o širokom rasponu prirodnih i ljudskih utjecaja (Ahearn i sur., 2005; Liao i sur., 2018). Stoga se zaštita voda ostvaruje nadzorom nad stanjem kvalitete voda i izvorima onečišćenja, kontrolom onečišćenja, zabranom ispuštanja onečišćujućih tvari u vode i zabranom drugih radnji koje mogu izazvati onečišćenje vodenog okoliša i okoliša u cjelini. Postizanje dobrog statusa svih površinskih i podzemnih voda do 2027. godine glavni je cilj Okvirne direktive o vodama, što predstavlja ispunjavanje određenih ekoloških, kemijskih i hidromorfoloških standarda (European Commission, 2000; Voulvoulis i sur., 2017). To znači da površinske vode trebaju sadržavati samo minimalne onečišćujuće tvari te da trebaju osigurati gotovo prirodno stanište za biljke i životinje. Do 2015. godine dobar ekološki status postignut je samo za polovinu kopnenih voda. Ipak, danas su vode u Europi puno čišće nego prije 30-ak godina, najviše zbog ulaganja u sustave kanalizacije gradskih otpadnih voda. Kakvoća vode je poboljšana, no opterećenost voda hranjivim tvarima i dalje je problem, a najvažniji pritisci koji utječu na ekološki status rijeka su točkasti, raspršeni izvori onečišćenja i hidromorfološka degradacija (Hering i sur., 2014). Ovakva opterećenja uzrokuju nepovoljan ekološki status, a u pravilu su rezultat djelovanja hidroelektrana, plovidbe, poljoprivrede, zaštite od poplava i urbanog razvoja.

Više od 40% riječnih ekosustava je danas ugroženo onečišćenjem iz raspršenih izvora poput poljoprivrede. Prema tome, poljoprivredna proizvodnja je važan čimbenik onečišćenja, odnosno očuvanja kakvoće voda, tla i zraka te stabilnosti klime. Međutim, poljoprivredne površine se sve više šire zbog rastućih potreba za proizvodnjom hrane, što dovodi do povećanog pritiska na okoliš. Većina mjera koje se primjenjuju u poljoprivredi, kao što je gnojidba mineralnim i organskim gnojivima, navodnjavanje te primjena zaštitnih sredstava, štetno djeluju na kvalitetu i količinu raspoložive vode. Iako su razine dušika smanjene zbog implementacije Nitratne direktive (European Commission, 1991), one su još uvijek razmjerno visoke, osobito u nizinskim poljoprivrednim predjelima s intenzivnom

poljoprivrednom proizvodnjom. Osim toga, u površinskim i podzemnim vodama otkrivena je i visoka koncentracija poljoprivrednih pesticida (Web 1). Oborinske vode ispiru poljoprivredna zemljišta pa su bogate hranjivim tvarima i pesticidima, dok komunalne otpadne vode sadrže velike količine organske tvari. Onečišćenju iz točkastih izvora, poput industrijskih pogona, kanalizacijskih sustava i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, izloženo je između 20% i 25% europskih rijeka. Povećane količine dušika i fosfora u vodi vrlo često ukazuju na onečišćenje komunalnim otpadnim vodama, a problem predstavljaju i industrijske otpadne vode koje se ispuštaju bez odgovarajuće prethodne obrade. Također, još uvijek veliki broj kućanstava nije priključen na kanalizacijski sustav, pa probleme otpadnih voda rješavaju individualno, najčešće na načine koji nisu povoljni za okoliš (Web 1). Dakle, na kvalitetu površinskih voda značajno utječu oborinske vode koje se slijevaju s poljoprivrednih površina, kao i otpadne vode koje se iz komunalnog sustava odvodnje ispuštaju u prijemnike otpadnih voda.

1.2. Pokazatelji onečišćenja

Stanje površinskih voda određuje se na temelju ekološkog i kemijskog stanja vodnog tijela (Narodne novine, 2013a). Ekološko stanje površinskih voda ocjenjuje se u odnosu na biološke, hidromorfološke i osnovne fizikalno-kemijske i kemijske elemente koji prate biološke elemente, a koji su navedeni u Prilogu 2. Uredbe o standardu kakvoće voda, dok se kemijsko stanje površinskih voda ocjenjuje u odnosu na pokazatelje kemijskog stanja koji su navedeni u Prilogu 5. Uredbe o standardu kakvoće voda (Narodne novine, 2013a). Za rijeke se ocjena stanja na temelju osnovnih fizikalno-kemijskih i kemijskih elemenata koji prate biološke elemente, određuje prema mjerodavnim vrijednostima koja se izračunavaju na temelju svih rezultata mjerenja, izmjerenih u različitim razdobljima tijekom kalendarske godine, a njihove granične vrijednosti navedene su u tablicama 6., 9., 11. i 13. Priloga 2.C. Uredbe o standardu kakvoće voda (Narodne novine, 2013a).

1.2.1. Zakiseljenost, alkalitet-m, specifična vodljivost vode

Zakiseljenost, odnosno pH, važna je varijabla u procjeni kakvoće vode, jer utječe na mnoge biološke i kemijske procese unutar vodnog tijela. Većina jezera i tekućica ima pH između 6,5 i 8,5, a to su optimalni uvjeti za život većine biljnih i životinjskih vrsta. Niže vrijednosti se mogu pojaviti u vodama bogatim organskom tvari, a više vrijednosti u eutrofnim vodama.

U nezagađenim se vodama pH uglavnom kontrolira ravnotežom između ugljikovog dioksida, karbonata i bikarbonatnih iona te drugih prirodnih spojeva, kao što su huminske kiseline (Iticescu i sur., 2014). Prilikom mjerenja učinaka ispuštanja otpadnih voda, pH se može upotrijebiti za određivanje opsega razrjeđenja otpadnih voda u prijemnim površinskim vodama. Osim toga, promjene u pH mogu ukazivati na prisutnost određenih otpadnih voda, osobito kada se kontinuirano mjere zajedno sa specifičnom vodljivošću vode (Ramirez i sur., 2014).

Prirodne vode zbog svog složenog kemijskog sastava imaju mogućnost sprječavanja promjena pH, odnosno imaju određen puferški kapacitet. Alkalitet vode je mjera puferške sposobnosti, tj. sposobnosti vode da neutralizira dodanu kiselinu. Time se izravno mjeri količina prisutnih bikarbonata, karbonata i hidroksidnih iona, ovisno o početnom pH. Vode niskog alkaliteta imaju nizak puferški kapacitet i stoga mogu biti osjetljive na promjene pH vrijednosti, npr. uslijed atmosferskog kiselog taloženja. Alkalitet voda s relativno visokim koncentracijama CO₂ (npr. vodna tijela na vapnenačkom području) može iznositi od 50 do 400 mg CaCO₃/L, a vodonosnici pješćanih ili silikatnih podloga obično imaju niži prirodni alkalitet. Vrlo visoke vrijednosti alkaliteta (više od 500 mg CaCO₃/L) mogu se naći u vodama s niskim koncentracijama Ca i Mg ili u vodama koje su podložne prirodnom omekšanju (tj. kada voda prirodno sadrži visoke koncentracije Na⁺ i HCO₃⁻ iona). Alkalitet plitkih površinskih voda u ravnoteži je sa sedimentom, a do značajnijih promjena dolazi uslijed razrjeđenja (značajne oborine) ili koncentriranja vode (suša) ili ukoliko se u vodu unesu veće količine kiselih ili lužnatih spojeva (Boyd, 2015).

Na električnu vodljivost vode (EC) utječe količina otopljenih aniona (npr. klorida, nitrata, sulfata i fosfata) i kationa (npr. natrija, magnezija, kalcija, željeza i aluminijska). Negativne i pozitivne otopljene tvari doprinose pozitivno električnoj vodljivosti, dok neutralne organske tvari ne pridonose. Električna vodljivost vode je ovisna o temperaturi, stoga kao pokazatelja treba koristiti specifičnu vodljivost (SpecCond) (United States EPA, 2012). Osim toga, na električnu vodljivost voda značajno utječe i geologija područja. Općenito se može reći da vodna tijela, čija su podloga glinasta tla koja sadrže puno minerala, imaju veću SpecCond od vodnih tijela na inertnim stijenama (npr. granit). Specifična vodljivost tekućica kreće se u rasponu od 50 do 1500 μS/cm, a industrijske otpadne vode mogu imati vrijednosti i do 10 000 μS/cm. Općenito, značajne promjene u SpecCond smatraju se pokazateljima ispuštanja otpadnih voda (United States EPA, 2012; Ramirez i sur., 2014).

1.2.2. Ukupni organski ugljik, biološka i kemijska potrošnja kisika

Organska tvar kao nositelj energije ima bitnu ulogu u vodenom ekosustavu. Utječe na biogeokemijske procese, kruženje hranjivih tvari, biološku dostupnost, transport i interakcije kemijskih spojeva. Sadržaj organske tvari obično se mjeri kao ukupni organski ugljik (TOC mg C/L) i otopljeni organski ugljik (DOC, mg C/L), koji su temeljne komponente ciklusa ugljika. Organsku tvar u vodi čine tisuće sastojaka, uključujući makroskopske čestice, koloidne čestice, otopljene makromolekule i specifični spojevi (Niemiřycz i sur., 2006). Organski ugljik u vodi nastaje razgradnjom prirodnih organskih tvari (humusnih kiselina, fulvinske kiselinae, uree i sl.) i/ili iz sintetičkih izvora (deterđženti, pesticidi, gnojiva, herbicidi, industrijske kemikalije i klorirane organske tvari). Sadržaj organskog ugljika u rijekama ovisi o veličini vodotoka i slivnog područja, vremenu uzorkovanja (ima sezonalni karakter), ali na sadržaj organskog ugljika utječu i parametri kao što su salinitet, pH, mikroba aktivnost i okolna vegetacija (Bayram i sur., 2011., Nacar i Satilmis, 2017., Lidman i sur., 2017).

Kada se u vodotok ispuštaju otpadne vode bogate organskom tvari, mikroorganizmi je razgrađuju smanjujući sadržaj otopljenog kisika u vodi. Osnovni pokazatelji utvrđivanja prisutnosti organskog onečišćenja u površinskim kopnenim vodama su biokemijska potrošnja kisika (BPK) i kemijska potrošnja kisika (KPK). Biokemijska potrošnja kisika (BPK₅, izraženo kao mg O₂/L) izražava se kao količina kisika potrebna za oksidaciju organskog ugljika i dijelom organskog dušika, a time neizravno i organske tvari, te je jedna od najstarijih metoda za ocjenu organskog onečišćenja. Biokemijska potrošnja kisika nije najpouzdaniji pokazatelj količine organskih tvari u vodi, naročito kada voda sadrži nerazgradive organske tvari ili tvari koje ometaju rast mikroorganizama. Pokazatelj količine nerazgradive organske tvari u vodi je kemijska potrošnja kisika koja se izračunava iz potrošnje oksidacijskoga sredstva nužnoga za potpunu razgradnju organske nerazgradive tvari. Kemijska i biokemijska potrošnja kisika rastu s većim zagađenjem otpadnim vodama (Lee i sur., 2016).

1.2.3. Hranjive tvari

Količina hranjivih tvari u vodotocima može varirati tijekom vremena i često je pod različitim utjecajima, bilo autohtonog ili alohtonog podrijetla (Ahearn i sur., 2005). Dušik (N) i fosfor (P) imaju važnu ulogu u biogeokemijskom funkcioniranju vodenih ekosustava. Unos N i P

u površinske vode pojačavao se tijekom 20. stoljeća, što je dovelo do široko rasprostranjenog problema eutrofikacije (Jarvie i sur., 2006; Withers i Jarvie, 2008). Dušik je esencijalni element za žive organizme kao važan sastojak bjelančevina. U okolišu se anorganski dušik pojavljuje u rasponu oksidacijskih stanja kao nitrat (NO_3^-) i nitrit (NO_2^-), amonijev ion (NH_4^+) i molekularni dušik (N_2) te podliježe biološkim i nebiološkim promjenama kao dio ciklusa dušika. Fosfor je također jedan od esencijalnih hranjivih tvari potrebnih za život organizama. Ograničavajući je nutrijent za rast algi i vodenih biljaka i stoga kontrolira primarnu produktivnost vodnog tijela. Fosfor u vodi nalazimo u više oblika: otopljenom i/ili partikularnom obliku, kao ortofosfat (o-PO_4^{3-}), polifosfat ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$) i organski fosfor. Osim toga, anorganski i organski fosfor se nalaze u sedimentu i mulju (Wetzel, 2011). Prirodne pozadinske („background“) koncentracije ortofosfata u vodi mijenjaju se ovisno o čimbenicima, kao što su geologija slivnog područja i tip tla. Prirodnim se smatraju rasponi od 0 do 10 $\mu\text{g P/L}$. Također, koncentracije nitrata ispod 0,3 mg N/L smatraju se prirodnim ili pozadinskim koncentracijama za većinu europskih rijeka. Međutim, pozadinske koncentracije za neke rijeke iznose i do 1-1,5 mg N/L (Dodds, 2007).

Dakle, prekomjeren unos i dušika i fosfora u vodna tijela može dovesti do eutrofikacije, što uzrokuje ekološke promjene koje rezultiraju gubitkom biljnih i životinjskih vrsta, te imaju negativne utjecaje na korištenje vode u različite svrhe.

1.2.4. Mikrobiološki pokazatelji onečišćenja

Prirodne vode služe kao stanište za širok raspon mikroorganizama, među kojima su i mikroorganizmi fekalnog materijala. Prisutnost fekalnih mikroorganizama (FM) u površinskim vodama ukazuje da postoji određeni put kontaminacije vodenog okoliša iz okolnog krajolika. Primjerice, velike količine oborina koje padnu u relativno kratkom vremenu mogu uslijed ispiranja zemljišta i pojačanog pritiska na kanalizacijski sustav dovesti i do pojačanog mikrobiološkog opterećenja vodotoka (van der Hoven i sur., 2017; Rio i sur. 2017). Fekalni mikroorganizmi uključuju patogene i nepatogene mikroorganizme, ali uvijek ukazuju na prisutnost fekalne kontaminacije, kao npr. *Escherichia coli* i enterokoki (Noble et al., 2003). Fekalni koliformi kao indikatori fekalnog onečišćenja povezani su s povećanim rizikom za zdravlje ljudi kada se otkriju u većim koncentracijama u vodama koje se koriste za rekreaciju, navodnjavanje, preradu poljoprivrednih proizvoda, ribarstvo i upotrebu u domaćinstvima. Stoga je mikrobiološka kvaliteta vode globalni problem kako u

pogledu standarda zaštite okoliša, tako i zaštite zdravlja ljudi i životinja (World health statistics, 2014).

1.2.5. Specifične onečišćujuće tvari

Kao rezultat ljudskih aktivnosti u okoliš dospijeva i na tisuće sintetskih organskih spojeva. Ovi spojevi imaju vrlo različita fizikalna, kemijska i toksikološka svojstva, a praćenje koncentracija svakog pojedinačnog spoja u vodi je teško izvedivo. Ipak, moguće je odabrati prioritetne organske onečišćujuće tvari na temelju njihove prevalencije, toksičnosti i drugih svojstava. Primjeri takvih spojeva su mineralna ulja, naftni proizvodi, fenoli, pesticidi, poliklorirani bifenili (PCB), policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) i surfaktanti. Okvirna direktiva o vodama (European Commission, 2000) trenutno navodi 45 onečišćujućih tvari kao prioritetne tvari. Da bi imalo dobru kakvoću vode, vodno tijelo može sadržavati samo neznatne količine tih tvari. Međutim, postoji više od 100 000 različitih kemijskih tvari koje svakodnevno koristimo i koji završavaju u našem okruženju i našoj vodi.

Klasifikacija pesticida uglavnom se bazira na njihovoj kemijskoj strukturi (organoklorovi, organofosfatni pesticidi, itd.), primjeni (poljoprivreda, javno zdravstvo), ciljnim organizmima (insekticidi, herbicidi, fungicidi itd.). Nadalje, organoklorovi pesticidi (OCP) prema kemijskoj strukturi dijele se na pesticide ciklodienske strukture (to su npr. aldrin, dieldrin, heptaklor), klorirane terpene (npr. poliklorkamfeni), halogenirane aromatske spojeve (npr. bisklorofenili kao DDT) i cikloparafine kao što su heksaklorcikloheksani (HCH) i heksaklorbenzen (HCB) (Jayaraj i sur., 2016). Nakon drugog svjetskog rata započela je široka uporaba OCP-a kao insekticida i fungicida u poljoprivredi te za suzbijanje malarije i tifusa. Najviše su se koristili DDT, HCH (α -, β - i γ -izomer lindan) i HCB, a njihova uporaba danas je zabranjena u velikoj većini zemalja (Aktar i sur., 2009). Organoklorovi pesticidi poput DDT-a, HCB-a, dieldrina i α - i β -heksaklorocikloheksana (α - i β -HCH) uklonjeni su s tržišta zbog njihovog dugog poluživota u prirodi te dokazane bioakumulacije u masnom tkivu i majčinom mlijeku (Du i sur., 2016). Unatoč tome, organoklorovi pesticidi i njihovi metabolički produkti zadržali su se u okolišu, uključujući hranidbeni lanac, što je rezultiralo njihovom širokom rasprostranjenošću, iako je smanjena izloženost.

AOX je kratica za veliki broj "adsorbilnih organskih halogenih" spojeva koji su topivi u vodi ("X" je oznaka za klor, brom i jod). Sam naziv AOX pokriva veliku skupinu spojeva od jednostavnih hlapljivih tvari kao što su triklorometan (kloroform) do složenih organskih

molekula poput dioksina/furana s izrazitim toksičnim svojstvima. AOX su sveprisutni u površinskoj vodi, podzemnoj vodi, morskoj vodi, tlu i padalinama. Istraživanja su pokazala da se ova široko rasprostranjena pojava organohalogenih spojeva u vodi može objasniti prirodnom halogenacijom organske tvari (Kinani i sur., 2016). Osim toga, adsorbilni organski halogeni najčešće se generiraju u industriji celuloze i papira tijekom postupka izbjeljivanja. Nastaju kao rezultat reakcije između preostalog lignina iz drvenih vlakana i klora koji se koristi za izbjeljivanje, tijekom postupka obrade vode prilikom dezinfekcije klorom, kalcijevim ili natrijevim hipokloritom. Mnogi od ovih spojeva su teško razgradivi i imaju dugo razdoblje poluživota. Neki od njih pokazuju tendenciju bioakumulacije, dok su nekima dokazana kancerogena i mutagena svojstva pa ih je nužno ukloniti ili razgraditi iz otpadnih voda prije ispuštanja u prijemnike. Upravo njihova značajna toksičnost i rasprostranjenost u okolišu zahtijevaju kontinuirano praćenje. Stoga je njihova dozvoljena koncentracija u otpadnim vodama zakonski regulirana, a prema Uredbi o standardu kakvoće voda, (Narodne novine, 2013a) standard kakvoće vode za prosječnu godišnju koncentraciju iznosi 50 µg/L.

Za razliku od većeg broja organskih zagađivala koji nisu inicijalno prisutni u vodenim ekosustavima (poput organoklorovih pesticida), metali kruže kroz biogeokemijske procese. Metali predstavljaju opasnost za sediment, akvatične ekosustave, ali i za ljude zbog izražene sposobnosti adsorbiranja za sediment, perzistentnosti, toksičnosti i sposobnosti bioakumulacije. Metali koji imaju geokemijsko podrijetlo, uobičajeno se nalaze u manje pristupačnim ili sasvim nepristupačnim oblicima. S druge strane, metali koji su dospjeli iz antropogenih izvora se najčešće nalaze u oblicima koji su relativno lakše biodostupni. U aerobnim uvjetima dostupnost i sudbina metala u tragovima je blisko povezana sa željeznim i manganovim oksidima i hidroksidima, dok u anoksičnim uvjetima sulfidi imaju dominantnu ulogu u distribuciji metala u tragovima (Saulnier i Mucci, 2000). Cink i bakar su dva mikronutrijenta neophodna za život, a njihovi glavni rezervoari su silikatna podloga, oceani i kopnene vode (Moynier i sur., 2017). Na globalnoj razini, unos otopljenog cinka u rijeke ($0,33 \pm 0,20\%$, Little et al., 2014) je blizu pozadinskih koncentracija ($0,31 \pm 0,12\%$, Moynier i sur., 2017). Cink je kod nižih pH vrijednosti relativno mobilan, a često se adsorbira na minerale glina, organsku tvar te oksid-hidrokside željeza i mangana. Najniže koncentracije Zn vezanog za suspendiranu partikularnu tvar su izmjerene u vodotocima pozolske, lesivirane i pseudoglejne podloge i povezane su s vrlo niskim sadržajem pokretnih metala, kao što su Na, Ca i elementima koji se tradicionalno nalaze u tragovima (K, Mg) u

takvim uvjetima (Sparks, 2001). Što se tiče bakra, za većinu svjetskih rijeka, unos otopljenog bakra iznosi 0,68‰ (Vance i sur., 2008), značajno više u odnosu na unos putem suspendirane partikularne tvari ($0.08 \pm 0.20\%$, Moynier i sur., 2017). Bakar u vode može dospjeti korištenjem različitih agrokemikalija, a nalazi se u životinjskoj hrani, kompostu, otpadnom mulju, itd. Cink kao i bakar se u povećanim koncentracijama mogu pojaviti u tlima koja su gnojena pilećim i svinjskim izmetom, a javljaju se i kao posljedica obogaćenja stočne hrane. Osim toga, bakar i cink mogu dospjeti u prirodne vode i iz industrijskih otpadnih voda.

Prema svemu do sada navedenom, zbog vrlo velikog broja tvari koje tvore složene smjese u vodenim ekosustavima, sve je teže i skuplje napraviti sustavne analitičke analize u istraživanim vodnim tijelima. Štoviše, ovaj čisto kemijski pristup ne daje ekološki značajne informacije o vremenskim promjenama izloženosti ili interaktivnim učincima zagađivala (Kumar i Han, 2010). Sukladno smjernicama Okvirne direktive o vodama (European Commission, 2000), stanje površinskih voda određuje se prema ekološkom i kemijskom statusu vodnog tijela. Procjena ekološkog stanja temelji se na analizi različitih bioloških komponenti, a fizikalno-kemijski i hidromorfološki pokazatelji samo nadopunjuju ovu procjenu.

1.3. Biotestovi

Za procjenu kvalitete površinskih voda, osim kemijskih metoda, danas se sve češće koriste i biološke metode. Analize provedene takvim metodama jeftinije su i zahtijevaju manje vremena. Biološke metode ispitivanja uključuju i biomonitoring i bioanalitičke metode. Biomonitoring vode koristi se za procjenu stanja i razine onečišćenja. Biomonitoringom se nastoje prikupiti podatci o onečišćenju vode i predvidjeti utjecaj onečišćenja pomoću bioindikatorskih organizama koje karakterizira posebna osjetljivost na određena zagađivala. Biomonitoring je relativno jeftina, jednostavna i brza alternativa jer se ovom metodom može provesti procjena stanja većih područja. U slučaju pozitivnih rezultata, mogu se izvršiti kemijske analize na posebno pogođenim lokacijama, što zapravo predstavlja značajnu uštedu vremena i novca. Bioanalitičke metode, s druge strane, temelje se na biološki aktivnim receptorima zagađivala. Za procjenu stupnjeva onečišćenja koriste se biosenzori kao što su virusi, bakterije, protutijela, enzimi te biotestovi (Szczerbińska i Gaczyńska, 2015). Biotestovi se temelje na korištenju živih organizama koji reagiraju specifično na onečišćenje vode metalnim, organskim (npr. PAHs, PCB, pesticidi, farmaceutici) i biogenim spojevima.

Analize se provode u laboratorijima, a ne na terenu. Biotestovi se, osim njihove široko prihvaćene uporabe za standardna ispitivanja različitih fizičkih i kemijskih svojstava kemikalija, koriste i za praćenje kakvoće vode u SAD-u, Kanadi i Europskoj uniji (USEPA, Environment Canada, OECD). U takvim biotestovima primjenjuju se testni organizmi koji reagiraju na onečišćujuće tvari u vodi. Sam biotest ne može odgovoriti na pitanje koji je od mnogih zagađivala odgovoran za promjenu biološke aktivnosti odabranog eksperimentalnog organizma. Štoviše, interakcije između tvari prisutnih u vodi također utječu na biološku aktivnost eksperimentalnog organizma te kao posljedicu mogu imati toksični učinak na testni organizam (Czaplicka-Kotas i Lodowska, 2014). Izbor modelnih testnih organizama za ispitivanje toksičnosti ovisi o osjetljivosti na specifične onečišćujuće tvari, pri čemu se koriste mnoge vrste fitoplanktona, zooplanktona i makroskopskih organizama.

1.3.1. Biljni biotestovi

Struktura zajednice i interakcije unutar hranidbenih mreža vodenih ekosustava određuju funkcioniranje i stabilnost ekosustava kao što je otpornost na obogaćivanje vode hranjivim tvarima. Makrofiti su glavna skupina primarnih proizvođača i nalaze se pri dnu hranidbenih lanaca u vodenim ekosustavima pa prema tome bilo kakvi negativni učinci na makrofitskoj vegetaciji mogu imati ozbiljne posljedice na cijeli hranidbeni lanac te time narušiti funkcionalnost vodenih ekosustava. Među njima, akvatični makrofiti koji pripadaju porodici *Lemnaceae* privlačni su eksperimentalni modelni organizmi iz nekoliko razloga: jednostavne su strukture, vrlo su male biljke, imaju visoki stupanj homogenosti, te ih karakterizira iznimna lakoća uzgoja u kulturama i visoka stopa rasta (vrijeme udvostručenja od 2-4 dana) (Kumar i Han, 2010; Lahive i sur., 2011). Štoviše, ove biljke imaju i važnu ekološku ulogu, široko su rasprostranjene, a poznato je i da su vrlo osjetljive na organske i anorganske tvari, uključujući herbicide (Scherr i sur., 2008; Kumar i Han, 2010), farmaceutike (Liu i sur., 2018) i metale (Lahive i sur., 2011). Stoga je korištenje vodenih leća kao testnih organizama jedna odabranih od odabira za procjenu utjecaja onečišćenja na slatkovodne ekosustave.

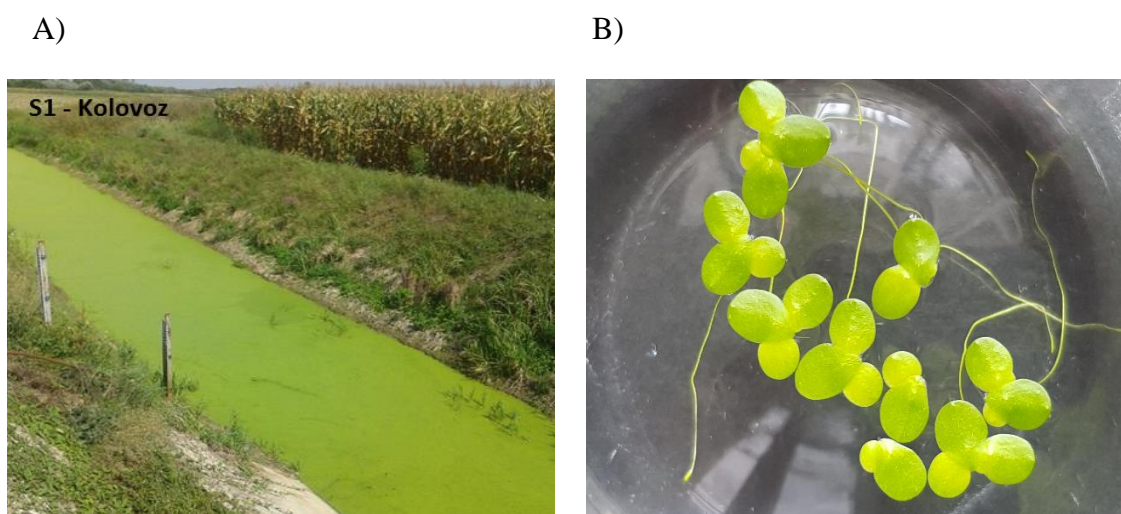
1.3.2. Lemna-test

Lemna-test je jedan od najviše korištenih standardiziranih testova za više biljke koji se može koristiti u širokom rasponu složenosti, od metaboličke razine do razine zajednice

(Mkandawire i sur. 2014). Zbog toga su neke internacionalne i nacionalne regulatorne agencije razvile specifične smjernice za provođenje Lemna-testa. OECD Lemna-test (2006) protokol razvijen je za testiranje određenih tvari i proizvoda, dok je ISO protokol (ISO 20079, 2005) razvijen za testiranje tvari i smjesa otopljenih u vodi, obrađene komunalne otpadne vode i industrijske otpadne vode. Oba protokola temelje se na inhibiciji rasta odnosno razmnožavanja biljaka u periodu od sedam dana, a preporučuju korištenje ukupne površine frondova („frond“ ili članak je tijelo biljke) kao krajnju točku koja je jednako ili više osjetljiva u odnosu na broj frondova. Lemna-test se može izvoditi kao statički test (bez izmjene hranjive otopine), test s periodičnim obnavljanjem hranjive otopine i protočni test (uz kontinuiranu izmjenu hranjive otopine tijekom pokusa). Statički Lemna-test može trajati četiri, pet, sedam ili četrnaest dana, ovisno o volumenu hranjivog medija.

1.3.3. Vodena leća (*L. minor* L.) kao testni organizam

U hrvatskoj flori zastupljeni su rodovi: vodena leća (*Lemna*) trima vrstama, barska leća (*Spirodela*) vrstom *S. polyrhiza* i sitna leća (*Wolffia*), s vrstom *W. arrhiza*, najmanjom europskom cvjetnicom. Najčešće korištene vrste u standardnom Lemna-testu su mala vodena leća (*Lemna minor* L.), (slika 1B) i grbasta vodena leća (*Lemna gibba* L.). *L. minor* je široko rasprostranjena, slobodnoplutajuća slatkovodna jednosupnica koja se može naći u vodama stajaćicama i sporotekućim rukavcima vodotoka, slobodno na površini vode ili neznatno ispod nje, često u velikom mnoštvu (slika 1A).



Slika 1. Slobodno plivajuće vrste iz porodice *Lemnaceae* na postaji S1 Odvodnog kanala Karašica, kolovoz 2015. godine (A), (foto: V. Peršić); vodena leća (*L. minor*) u hranjivoj otopini (B), (foto: D. Horvatić).

Vegetativni i rasplodni organi vodene leće su vrlo reducirani. Stabljike su slične lećastim ili duguljastim listićima duljine 1-8 mm, širine 0,6-5 mm, svijetlo zelene boje, s tri žile (rijetko pet) i malim zračnim prostorima koji pomažu održavanju na vodi. Korjenčići, u obliku tankih sitnih niti, vise u vodu. Sitni cvjetovi jednospolni su i jednodomni, bez ocvijeća. Jedan ili dva muška cvijeta s po jednim prašnikom i jedan ženski cvijet s jednim tučkom, nalaze se u zajedničkom ovoju (Zezulka i sur., 2013). Slično poput algi, imaju intenzivan kontakt s vodenim stupcem, iako za razliku od submerznih makrofita, a slično kopnenim biljkama, izmjenjuju plinove direktno s atmosferom (Mkandawire i sur., 2014).

L. minor ima široku primjenu u ekofiziološkim i ekotoksikološkim istraživanjima kao modelna biljka (Radić i sur., 2010 i 2011; Varga i sur., 2013; Sree i sur., 2015), ima visoki kapacitet bioakumulacije, odnosno akumulacije hranjivih tvari iz otpadne vode (Adhikari i sur. 2014, Liu i sur., 2017) i teških metala (Haarstad i sur., 2012), zbog čega ima potencijal za korištenje u tehnologijama bioremedijacije. U nedavnim je istraživanjima utvrđeno da sustavi s vodenim lećama mogu učinkovito uklanjati i organska mikrozagađivala kao što su lijekovi, proizvodi za osobnu njegu i pesticidi (Reinhold i sur., 2010; Matamoros et al., 2012) putem različitih mehanizama kao što su fotodegradacija, hidroliza, akumulacija i biorazgradnja (Iatrou et al., 2017)

1.3.4. Pokazatelji toksičnosti u Lemna-testu

Općenito, toksičnost se u biljkama najprije očituje na molekularnoj i biokemijskoj razini, a tek kasnije i na razini organizma (Davy i sur., 2001). Na morfološkoj razini na biljkama se mogu uslijed djelovanja raznih čimbenika uočiti promjene intenziteta obojanosti, nekroza, gubitak korijena, razdvajanje kolonija i druge slične promjene. Pokazatelji toksičnosti koji se najčešće prate u Lemna-testu su prirast broja biljaka, prirast mase svježe i suhe tvari, ukupna površina biljaka, koncentracija fotosintetskih pigmenata (Ambriović Ristov, 2007), duljina korijena (Park i sur., 2013), fluorescencija klorofila *a* za procjenu primjerice toksičnosti herbicida (Hulsen i sur., 2002; Kumar i Han, 2010), toksičnosti otpadnih voda (Juneau i sur., 2003; Radić i sur., 2010), nanočestica bakrovih oksida (Perreault i sur., 2010) i kadmija (Begović i sur., 2016). Također se prate parametri oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije, razina proteina i glutaciona, kao i aktivnost antioksidativnih enzima (Babić i sur., 2009; Vidaković-Cifrek i sur., 2015; Radić i sur., 2018).

1.3.4.1. Fotosintetski pigmenti

Fotosintetski pigmenti su odgovorni za apsorpciju i transformaciju svjetlosne energije u kemijsku energiju te sudjeluju u fotozaštitnim procesima i antioksidativnoj aktivnosti, pridonoseći tako učinkovitoj proizvodnji biomase i kisika (Kuczynska et al., 2015). U fotosintetskom aparatu viših biljaka najznačajniji su klorofili i karotenoidi. Modrozeleni klorofil *a* (Chla) i žutozeleni klorofil *b* (Chlb) apsorbiraju vidljivi dio spektra i imaju maksimume apsorpcije u crvenom (600-700 nm) i plavom (400-500 nm) dijelu spektra. Klorofil *a* prisutan je u reakcijskim centrima fotosustava I (PSI) i fotosustava II (PSII) te ima ključnu ulogu u fotosintetskom prijenosu elektrona, dok se klorofil *b* nalazi u antena kompleksu gdje apsorbira fotone i prenosi ih do reakcijskog središta te ima ulogu pomoćnih fotosintetskih pigmenata. Vanjski dio antena kompleksa čine kompleksi LHC (engleski akronim koji dolazi od naziva „large harvesting complex“) koji na sebe vežu fotosintetske pigmente, a unutrašnji dio integrirani je dio reakcijskog središta u koji se prenose fotoni apsorbirani na vanjskim antenama. Dok je omjer Chla/Chlb LHC-I fotosustava I približno 3, omjer Chla/Chlb LHC-II fotosustava II iznosi od 1,1 do 1,3. Razina LHC-II fotosustava II je varijabilna i prilagodljiva na svjetlosne uvjete (Lichtenthaler i Buchmann, 2001). Karotenoidi (Car) su narančasto-žuti pigmenti koji imaju dvostruku ulogu: prijenos energije na klorofil, čime se proširuje spektar apsorpcije svjetlosti, i zaštita fotoosjetljivog fotosintetskog aparata od oksidativne razgradnje (Pevalek-Kozlina, 2003).

Dakle, omjer Chla/Chlb koji je povezan s veličinom antenskih sustava kod biljaka, pokazatelj je funkcionalnosti fotosintetskog sustava i prilagodljivosti na svjetlosne uvjete. Omjer Chl(a+b)/Car pokazatelj je zelene boje biljaka. U normalnim uvjetima iznosi između 4,2 i 5 kod biljaka izloženih suncu, te između 5,5 i 7 kod biljaka sjene. Niže vrijednosti ukazuju na senescenciju, stres i oštećenje fotosintetskog sustava (Lichtenthaler i Buchmann, 2001).

1.3.4.2. Ukupni topljivi proteini

Dva su glavna razloga za ekstrakciju proteina iz biljnih tkiva: ispitivanje razine proteina ili aktivnosti enzima u sirovom ekstraktu te pročišćavanje relativno velikih količina enzima ili proteina. Prema tome, metode ekstrakcije proteina ovise o namjeni, tipu tkiva i enzimima ili proteinima koji se trebaju izdvojiti. Općenito, što je zdravije biljno tkivo, veća je aktivnost

koja će se izraziti (osim ako je ciljni protein povezan sa stresom). Osim toga, mlađe biljke i neozlijeđena tkiva često imaju manje interferirajućih spojeva.

Proteini predstavljaju poveznicu između genoma i višestrukih staničnih aktivnosti. U genima je pohranjena biološka informacija, a protein je funkcionalni predstavnik gena. Da bi se informacija iz gena prevela u protein, mora se dogoditi niz važnih procesa u stanici, kao što su transkripcija molekule mRNA, transport mRNA, translacija proteina te kontrola stabilnosti i kvalitete i njihov transport do krajnjeg odredišta u stanici (Balen, 2016). Analize strukture i funkcije proteina mogu se izvoditi na razini proteoma, sekretoma i interaktoma. Kvantitativna ekspresija proteina u stanici predstavlja proteom, koji je vrlo dinamičan jer na ekspresiju proteina utječu različiti čimbenici. Sekretom se odnosi također na sve proteine jednog organizma, a predstavlja kvantitativnu ekspresiju proteina izlučenih iz stanice ili organizma pod precizno definiranim uvjetima. Treća razina je interaktom, koji se odnosi se na fizičke interakcije između molekula proteina s drugim proteinima, ali i proteina s drugim vrstama molekula.

Jedan od učinaka oksidativnog stresa u biljkama izazvanog, npr. teškim metalima može biti promjena metabolizma proteina. Stoga se sadržaj ukupnih topljivih proteina koristi kao važan pokazatelj fiziološkog stanja biljaka. Primjerice, u svom radu Doğanlar (2013) je utvrdila da Cd ima veliki učinak na ukupni sadržaj proteina u vrstama *L. gibba*, *L. minor* i *S. polyrhiza*. Smanjeni sadržaj proteina zbog metala može se pripisati povećanju degradacije proteina proteazom ili drugim kataboličkim enzimima povezanim s metabolizmom proteina (Mishra i sur., 2007). Slični rezultati zabilježeni su u vrstama *Eichornia crassipes*, *L. minor* i *L. trisulca* (Mishra i sur., 2007; Kanoun-Boulé et al., 2009; Malec i sur., 2010). S druge strane, povećani ukupni sadržaj topljivih proteina u vrste *S. polyrhiza* može biti posljedica povišene razine proteina povezanih sa stresom kao što su polipeptidi koji imaju sposobnost helirati metalne ione te imaju ulogu u homeostazi ili detoksikaciji teških metala (Van Hoeck i sur., 2015).

1.3.4.3. Lipidna peroksidacija

U kulturi vodene leće *in vitro* mogu se osim pokazatelja rasta u Lemna-testu mjeriti i biokemijski pokazatelji toksičnosti koji se često javljaju prije vidljivih posljedica te ukazuju na mehanizam djelovanja stresne tvari ili stresnog čimbenika (Ambriović Ristov, 2007). U normalnim biološkim uvjetima, molekula kisika neenzimatskom oksidacijom povremeno

oduzima elektrone drugim molekulama, što uzrokuje nastanak slobodnih radikala, nestabilnih kemijskih čestica koje u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron. Relativno male količine reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) trajno se proizvode u svim aerobnim organizmima. Međutim, velike količine ili nedovoljno učinkovito uklanjanje ROS-a rezultira oksidacijskim stresom koji može oštetiti biološke makromolekule i uzrokovati metaboličke poremećaje. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) membranskih fosfolipida često su meta stvorenih slobodnih radikala, što rezultira lipidnom peroksidacijom koju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$), međutim i pojedini drugi radikali, kao što su $\text{HO}_2\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$, mogu pokrenuti proces lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007).

Jedan $\text{OH}\cdot$ može dovesti do peroksidacije mnogih PUFA, jer su reakcije koje sudjeluju u tom procesu dio cikličke lančane reakcije. Glavna mjesta napada u molekulama fosfolipida su dvostruke veze između dva ugljikova atoma te esterska veza između glicerola i masne kiseline. Proces lipidne peroksidacije obuhvaća tri različita stadija: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Inicijalna faza lipidne peroksidacije je korak kojim se proizvodi radikal masnih kiselina. Hidroksilni radikali ili superoksidi mogu reagirati s PUFA metilnim grupama posljedično stvarajući hidroperoksidi, lipidne peroksidne radikale i konjugirane diene, dok su peroksidni radikali visokoreaktivni i sposobni su prolaziti propagaciju lančane reakcije. Razgradnja lipidnih hidroperoksida može lako proizvesti aldehide (malondialdehid, krotonaldehid i akrolein), lipidne alkoksilne radikale alkana, lipidne epoksidi i alkohole (Labudda, 2013).

Malondialdehid (MDA), jedan od završnih citotoksičnih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina fosfolipida, smatra se indikatorom oksidativnog stresa u biljaka te se njegovim mjerenjem može odrediti stupanj lipidne peroksidacije (Gutteridge, 1995). Visoka razina MDA znak je intenzivne lipidne peroksidacije u biološkim membranama, što dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim ionima te do moguće rupture stanice, otpuštanja njena sadržaja i u konačnici do stanične smrti (Štefan i sur., 2007).

1.3.5. Prednosti i nedostaci Lemna-testa

Prednost Lemna-testa u usporedbi s drugim biotestovima očituje se najviše u visoko homogenoj prirodi biljnog materijala. Lemna test zadovoljava kriterije idealnog testnog sustava: jednostavan, osjetljiv, jeftin, objektivan s dosta replika i niskim standardnim devijacijama (Mkandawire i sur. 2014). Dakle, kao što je već dosad i navedeno, vodena leća

ima niz svojstava koje ju čine prikladnom za laboratorijska istraživanja: vrlo je osjetljiva na nazočnost različitih tvari u hranjivoj podlozi, malih je dimenzija, jednostavne je građe, brzo se razmnožava, razmnožavanje je vegetativno, nije potreban veliki prostor za eksperiment, a hranjiva podloga je jednostavna i jeftina (Ambriović Ristov, 2007).

Nedostatak Lemna-testa je u različitosti postupaka u izvođenju testova, što znatno otežava usporedivost rezultata (Christen i Theuer, 1996). Različitosti u izvođenju se odnose na vrijeme trajanja testa, promatrane pokazatelje toksičnosti, hranidbeni medij koji se koristi te volumen i oblik posude u kojoj se biljke uzgajaju. Također, prilikom testiranja smjesa tvari, treba uzeti u obzir mogućnost interakcije sastojaka hranidbene podloge s komponentama smjese (Wang, 1992). Osim toga, prednosti Lemna-testa ujedno su i najznačajniji nedostaci procjene rizika vodenih ekosustava ako se radi samo na osnovu Lemna-testa. Naime, *L. minor* je jednosupnica, neosjetljiva primjerice na pojedine herbicide koji djeluju kao regulatori rasta (Belgers i sur., 2007), slobodnoplutajuća je pa su samo donja strana biljke i korijen izloženi vodi i toksičnim tvarima, čime se razlikuje u načinu izloženosti u odnosu na primjerice submerzne makrofite. Upravo zbog toga je neosjetljiva i na toksikante koje dospijevaju u vodeni okoliš i imaju brzo vrijeme sedimentacije (vrlo brzo tonu na dno). Zatim, *L. minor* raste u kolonijama s kratkim vremenom udvostručenja i razlikuje se u odnosu na većinu ostalih vodenih biljaka u stopi oporavka (Hanson i sur., 2003). To znači da kratko generacijsko vrijeme omogućava relativno visoki reprodukcijski potencijal, a samim time i visoki potencijal oporavka.

1.4. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je utvrditi potencijal Lemna-testa u praćenju kvalitete voda na primjeru uzoraka vode Odvodnog kanala Karašica, koji je glavni recipijent slivnih voda poljoprivrednog područja i komunalnih otpadnih voda. U tu svrhu bilo je potrebno izmjeriti odabrane fizikalno-kemijske i mikrobiološke parametre kao pokazatelje onečišćenja u vodi Odvodnog kanala Karašica. Mjerenjem pokazatelja toksičnosti u Lemna-testu (prirast broja biljaka i masa svježe tvari, koncentracije fotosintetskih pigmenata, ukupnih proteina i malondialdehida), bilo je potrebno eksperimentalno ispitati utjecaj prisutnog onečišćenja u vodi na rast *L. minor* te utvrditi primjenljivost Lemna-testa u procjeni ukupne toksičnosti realnih uzoraka vode iz okoliša. (koliko dobiveni rezultati Lemna-testa upotpunjuju realnu sliku toksičnosti uzoraka vode iz okoliša).

2. Materijali i metode

2.1. Područje istraživanja

Područje malog sliva Baranja sjeveroistočni je dio Osječko-baranjske županije, smješteno u međuriječju Drave i Dunava te predstavlja zasebnu hidrotehničku cjelinu. S istoka je omeđeno rijekom Dunav, sa sjevera i zapada državnom granicom prema Republici Mađarskoj, a s juga rijekom Dravom. S teritorija Republike Mađarske u Baranju dotječe Odvodni kanal Karašica i presijeca državnu granicu kod naselja Luč u Općini Petlovac.

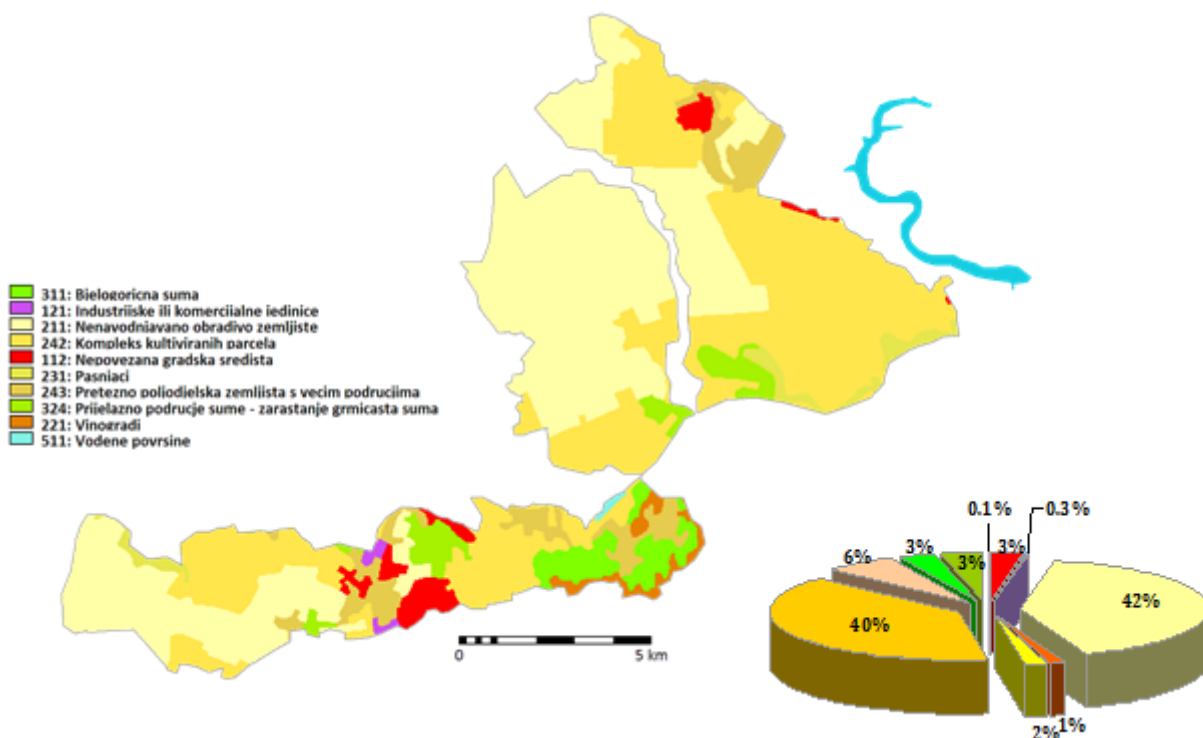
Odlukom Vlade Republike Hrvatske Odvodni kanal Karašica svrstan je u Popis voda I. reda, u međudržavne vode i umjetna vodna tijela (Narodne novine, 2010). Odvodni kanal Karašica ima ukupnu slivnu površinu 159 km², od toga se 44,80 km² nalazi u Republici Mađarskoj, a 114,20 km² u Republici Hrvatskoj. Ukupna dužina kanala je 44 km, od toga 30,6 km u Republici Hrvatskoj, 1 km zajedničke granice te još 12,4 km u Republici Mađarskoj, s trasom položenom paralelno s potokom Karašica. Dno Odvodnog kanala je za 2,5 - 3,0 m niže od dna potoka Karašica. Uzdužni pad kanala iznosi 0,17 ‰, širina dna 5,0 m, a nagib pokosa 1 : 1,5 s prosječnom dubinom u odnosu na okolni teren 3,50 m. Maksimalni protok iznosi 10,50 m³/s (Web 2).

U svom toku kroz Hrvatsku ima nekoliko manjih pritoka: Lačka, Remetin, Cerinje (mala Karašica) te stara korita Hatvana i Travnika. Sve su to pritoci sa sjeverne, nizinske strane, a s južne strane u Odvodni kanal dotječu otpadne vode s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Belom Manastiru te vode zapadnih obronaka Baranjskog brda. U uzvodnom dijelu, kanal je smješten u najnižim dijelovima desnog zaobalja potoka Karašica, a kod mjesta Popovac kroz sifon prelazi u lijevo zaobalje potoka Karašica te dolazi do naselja Gajić i Draž gdje se Marković kanalom usmjerava do crpne stanice Draž kapaciteta 1,5 m³/s kojom se voda iz Odvodnog kanala Karašica prebacuje u potok Karašica i odvodi u rijeku Dunav.

Do 1987. godine Odvodni kanal Karašica gravitacijski se ulijevao kroz ustavu Bučka u Topoljski Dunavac. Te godine, ustava Bučka se trajno zatvara iz razloga sprječavanja onečišćenja Topoljskog Dunavca vodama iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda koje dotječu Odvodnim kanalom Karašica. Retencija Topoljski Dunavac odlukom Vlade Republike Hrvatske svrstana je također u Popis voda I. reda u međudržavne vode (Narodne Novine, 2010).

Prema karti zemljišnog pokrova (CORINE Land Cover Hrvatska 2006), najveću površinu slivnog područja istraživanog Odvodnog kanala Karašica zauzimaju poljoprivredne površine

(kompleks kultiviranih parcela i nenavodnjavano obradivo zemljište te pretežno poljoprivredna zemljišta, a obuhvaćaju ukupno 88% slivne površine), slika 2.



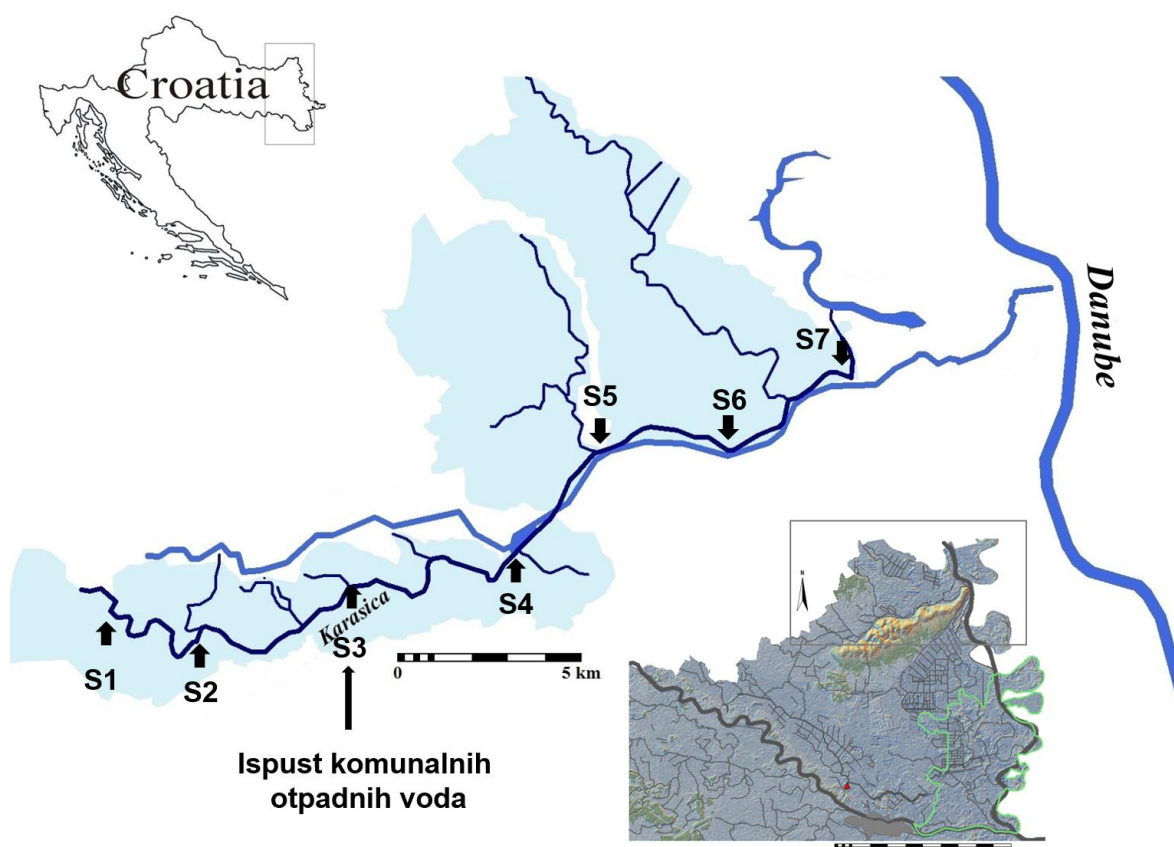
Slika 2. Zemljišni pokrov slivnog područja Odvodnog kanala Karašica.

Manje površine uz padine Banskog brda su pod vinogradima (1,5 km²) i pašnjacima (2,37 km²). Svega 3,8 km² površine prekriveno je bjelogoričnim tipom šume, a grmičasta šuma koja predstavlja prijelazno područje prema šumi prekriva oko 4 km² površine sliva. Nekoliko je naselja na području sliva koja zauzimaju površinu od 3,2 km². Najveće od njih je grad Beli Manastir uz koji su većim dijelom vezane i industrijske ili komercijalne jedinice površine 0.4 km².

2.2. Uzimanje uzoraka

Uzorci vode iz Odvodnog kanala Karašica uzimani su uzvodno s mosta na cesti pomoću boce za uzorkovanje po Van Dorn-u volumena 2,2 L na vertikali sa sredine kanala. Uzorkovanje za analizu fizikalno kemijskih pokazatelja kakvoće voda obavljeno je jednom mjesečno, od ožujka 2015. godine do veljače 2016. godine na sedam postaja slivnog područja Odvodnog kanala Karašica (slike 3-5), ukupne duljine 29,594 km:

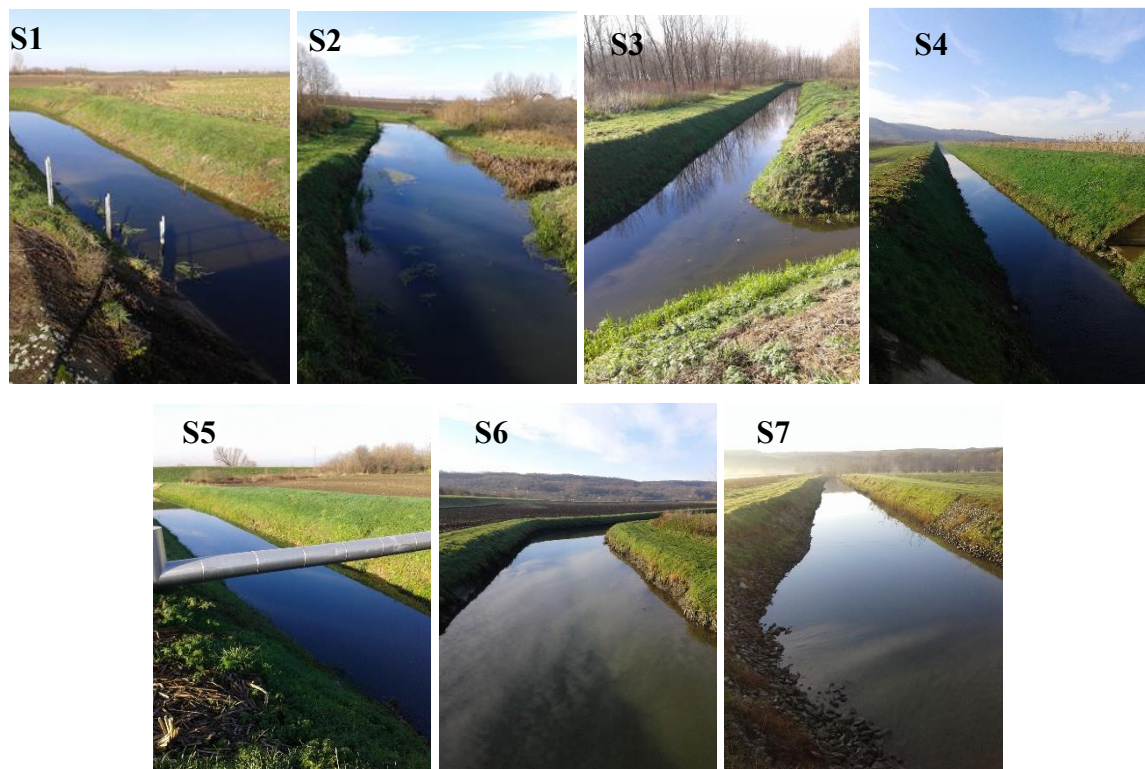
- S1 – Odvodni kanal Karašica između Luča i Petlovca (r. km 29 + 594);
- S2 – Odvodni kanal Karašica kod Šumarine (r. km 22 + 632);
- S3 – Odvodni kanal Karašica između Belog Manastira i Branjinog Vrhha (r. km 19 + 763);
- S4 – Odvodni kanal Karašica kod ribnjaka Popovac (r. km 13 + 566);
- S5 – Odvodni kanal Karašica kod Branjine (r. km 10 + 328);
- S6 – Odvodni kanal Karašica između Podolja i Gajića (r. km 7 + 599);
- S7 – Odvodni kanal Karašica između Gajića i Draža (r. km 2 + 007).



Slika 3. Prikaz vodotoka i istraživanih postaja u slivnom području Odvodnog kanala Karašica.



Slika 4. Prikaz istraživanih postaja (S1 – S7) u rujnu 2015. godine (foto: V. Peršić).



Slika 5. Prikaz istraživanih postaja (S1 – S7) u studenom 2015. godine (foto: V. Peršić).

2.3.Mjerenje fizikalno-kemijskih svojstava vode

Podaci o količini oborina dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda. Temperature vode i zraka mjerene su živinim termometrom s podjelom ljestvice 10/1°C. Pomoću prijenosnog multimetra WTW Multi 340i (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Njemačka) mjerena je koncentracija otopljenog kisika, zasićenost vode kisikom, pH i električna vodljivost (EC). Mjerenje koncentracija amonijevih (NH₄-N), nitritnih (NO₂-N) i nitratnih (NO₃-N) iona, organskog dušika (Kjeldahl-N) te ukupnog fosfora (TP) i dušika (TN), ortofosfata (PO₄-P), alkaliteta-m, biokemijske (BPK₅) i kemijske potrošnje kisika (KPK-Cr), ukupnog organskog ugljika (TOC) te natrija, kalija, magnezija i kalcija obavljeno je u Ekološkom laboratoriju Vodovoda d. d. Osijek prema metodama navedenim u tablici 1.

Tablica 1. Analitičke metode za analizu fizikalno kemijskih pokazatelja kakvoće voda.

Parametar	Metoda
Amonijak kao N, mg/L	HRN ISO 7150-1:1998
Nitrati kao N, mg /L	HRN ISO 7890-3:1998
Nitriti kao N, mg /L	HRN EN 26777:1998
Kjeldahl N, mg /L	HRN EN 25663:1993
Ukupni P, mg /L	HRN ISO 6878:2008
Ukupni N, mg /L	HRN ISO 5563:2001+NO ₂ -N+NO ₃ -N
Kloridi, mg /L	HRN ISO 9297:1998
Sulfati, mg /L	SM
Alkalitet-m, ml 0,1 HCl/100 ml	HRN EN ISO 9963-1:1998
o-fosfati, mg/L	HRN ISO 6878:2008
KPK, mg O ₂ /L	HRN ISO 15705:2003
BPK ₅ , mg O ₂ /L	HRN EN 1899-1:2004
TOC, mg /L	HRN EN 1484:2002
Natrij, mg /L	HRN EN ISO 1185:2010
Kalij, mg /L	HRN EN ISO 1185:2010
Magnezij, mg /L	HRN EN ISO 1185:2010
Kalcij, mg /L	HRN EN ISO 1185:2010

2.4.Mikrobiološka analiza

Uzorci vode za mirobiološku analizu uzimani su u svibnju, rujnu i studenom 2015. te veljači 2016. godine. Analize su napravljene u Zavodu za javno zdravstvo Osječko – Baranjske županije, a u vodi su analizirani fekalni koliformi, *Escherichia coli* i enterokoki (fekalni streptokoki) prema metodama navedenim u tablici 2.

Tablica 2. Metode za mikrobiološku analizu vode.

Parametar	Metoda
Fekalni koliformi, n/100 ml	*HRN EN ISO 9308-1:2000 i ispr. 1:2008
<i>Escherichia coli</i> , n/100 ml	*MBV 020 REV 4 (1.1.2016)
Enterokoki, n/100 ml	* HRN EN ISO 7899-2:2000

2.5. Određivanje specifičnih onečišćujućih tvari

Uzorkovanje vode za određivanje specifičnih onečišćujućih tvari obavljeno je u svibnju, rujnu i studenom 2015. te veljači 2016. godine. Analize su napravljene u Zavodu za javno zdravstvo Osječko – Baranjske županije, a analizirani su metali (željezo, bakar, cink, kadmij i olovo), ciklodienski pesticidi (aldrin, dieldrin, endrin, izodrin i heptaklor) i ukupni organoklorovi pesticidi, heksaklorcikloheksan (HCB, HCH- α , HCH- β , HCH- δ i lindan) te insekticidi (DDT i metaboliti) prema metodama navedenim u tablici 3.

Tablica 3. Metode za analizu specifičnih onečišćujućih tvari.

Parametar	Metoda
Metali	
Fe mg/L	DIN 38406-2:2000 (F)
Cu μ g/L	HRN EN ISO 15586:2008 (G)
Zn μ g/L	HRN EN ISO 15586:2008 (G)
Cd μ g/L	HRN EN ISO 15586:2008 (G)
Pb μ g/L	HRN EN ISO 15586:2008 (G)
Ciklodienski pesticidi	
Aldrin μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Dieldrin μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Endrin μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Heptaklor μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Izodrin μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Pesticidi organoklorovi ukupni (OCP)	HRN EN ISO 6468:2002
Heksaklorcikloheksani	
HCB μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
HCH- α μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
HCH- β μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
HCH- δ μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Lindan μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002
Insekticidi	
DDT i metaboliti μ g/L	HRN EN ISO 6468:2002

2.6. Lemna test

2.6.1. Kultura vodene leće (*L. minor* L.)

Mala vodena leća, *L. minor* L., korištena u ovom eksperimentu uzorkovana je u drenažnim kanalima istočne Hrvatske. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 2006. godine, biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajncić i Devidé (1980) i dalje kultivirane u sterilnim uvjetima u Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće korištena je Pirson-Seidel (PS) hranjiva otopina (Pirson i Seidel, 1950), a za istraživanja hranjiva podloga po Steinbergu (1946).

Uzorci vode za potrebe izvođenja Lemna testa uzimani su u svibnju, rujnu i studenom 2015. te veljači 2016. godine. Za određivanje utjecaja vode s istraživanih postaja Odvodnog kanala Karašica na rast vodene leće, uzgojena je jedna subkultura zdrave kolonije u 1L hranjive otopine po Steinbergu (1946) u tikvicama od 3L. Nakon 14 dana nova subkultura dobivena je prebacivanjem 30 zdravih kolonija u novu tikvicu od 3L. Biljke su uzgajane u uvjetima temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$ i izložene kontinuiranoj svjetlosti intenziteta $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Philips TL-D Fluo cijevi 36 W, hladno dnevno svjetlo) tijekom 8 dana prije postavljanja ekperimenta.

Za potrebe ekperimenta, 2-3 kolonije vodene leće su nasađivane u jažice plastičnih komorica (Jet Bio-Filtration) u koje je prethodno dodano po 10 ml uzorkovane vode, odnosno hranjivog medija (kontrola). Jedna komorica ima šest jažica i svaka je volumena 15 mL (slika 6).

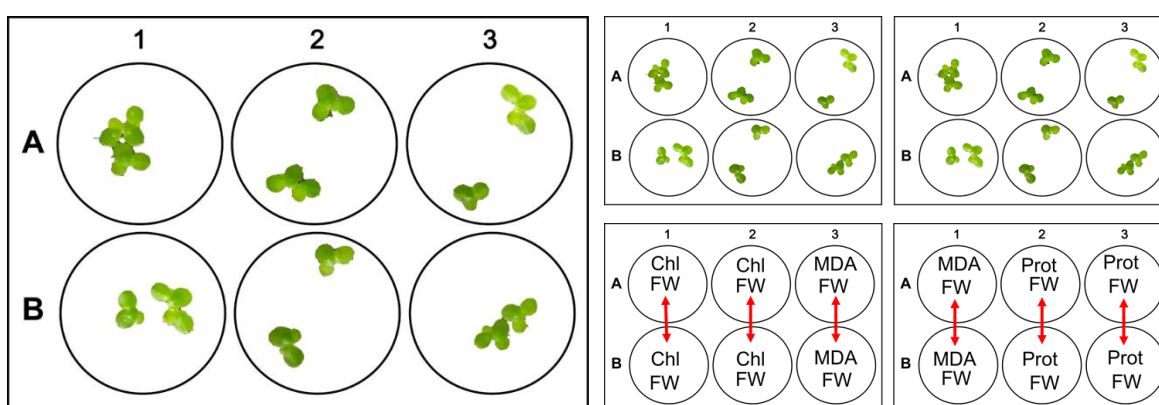
Plan nasađivanja u eksperimentalne komorice:

1 komorica (6 jažica \times volumen uzorka od 10 ml);

1 uzorak, 1 mjesec rađen je u 2 komorice za što je ukupno bilo potrebno 120 ml uzorka vode s postaja Odvodnog kanala Karašica. Potreban broj biljaka za nasađivanje bio je 7 FN/jažici ≈ 42 FN/ komorici ≈ 84 FN/uzorku (Slike 6 i 7). Uz svaki je set ekperimenta rađena kontrola (4 komorice) sa hranjivim medijem po Steinbergu (StMo). Svi rezultati uspoređivani su međusobno i u odnosu na kontrolu.



Slika 6. Nasađivanje vodene leće u eksperimentalne komorice sa uzorcima vode istraživanog Odvodnog kanala Karašica.



Slika 7. Shematski prikaz plana nasađivanja vodene leće u eksperimentalne komorice.

2.6.2. Određivanje prirasta broja i svježe mase biljaka

Prirast (μ) broja biljaka određivao se svakodnevnom prebrojavanjem svih biljaka koje su vidljive golim okom. Dobiveni podaci uvršteni su u jednačbu (OECD, 2006):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i}$$

pri čemu je:

μ_{i-j} - specifični prirast u vremenskom intervalu od i do j (dan^{-1});

N_i - broj biljaka u trenutku i N_j - broj biljaka u trenutku j;

t_i - početni trenutak eksperimenta (0);

t_j - konačni dan mjerenja (1,2,3..., 7).

Osim prirasta broja biljaka, iz svake su jažice, svake komorice, na kraju eksperimenta, a prije daljnje obrade, biljke izvađene, posušene ubrusom i izvagane te je kao rezultat prikazana svježa masa biljaka (FW, mg).

2.6.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

U svrhu spektrofotometrijskog određivanja koncentracije fotosintetskih pigmenata biljno je tkivo usitnjeno do finoga praha u tekućem dušiku. Nakon toga određena je točna masa usitnjenog tkiva u prethodno izvaganim i označenim plastičnim kivetama volumena 2 mL. Potom je slijedila ekstrakcija pigmenata na ledu tijekom 15 minuta uz dodatak 1 mL 80%-tnog hladnog acetona. Nakon ekstrakcije pigmenti su centrifugirani 10 minuta pri 18 000 g i temperaturi 4 °C. Supernatant je zatim dekantiran u plastičnu kivetu s čepom na navoj, a na preostali talog je ponovno dodano 1 mL acetona. Reekstrakcija je ponovljena još nekoliko puta sve do potpunog obezbojenja biljnog tkiva u talogu. Volumen supernatanta izmjeren je pomoću menzure. Ekstrakt je pretočen u staklenu kivetu te je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri valnim duljinama od 470, 646,8 i 663,2 nm. Koncentracije fotosintetskih pigmenata izračunate su prema Lichtenthaler (1987) te su izražene u mg/g svježe tvari:

$$\text{Chla} = \frac{(11,24 \times A_{663,2} - 2,04 \times A_{646,8}) \times V}{m \times 10^3}$$

$$\text{Chlb} = \frac{(20,13 \times A_{646,8} - 4,19 \times A_{663,2}) \times V}{m \times 10^3}$$

$$\text{Chla+b} = \frac{(7,05 \times A_{663,2} + 18,09 \times A_{646,8}) \times V}{m \times 10^3}$$

$$\text{Car} = \frac{[103 \times A_{470} - 1,9(11,24 \times A_{663,2} - 2,04 \times A_{646,8}) - 63,14(20,13 \times A_{646,8} - 4,19 \times A_{663,2})] \times V}{214 \times m \times 10^3}$$

pri čemu je:

A_{470} - apsorbancija uzorka pri 470 nm

$A_{646,8}$ - apsorbancija uzorka pri 646,8 nm

$A_{663,2}$ - apsorbancija uzorka pri 663,2 nm

V - ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u mL

m - masa uzorka za ekstrakciju u gramima.

2.6.4. Određivanje koncentracije proteina

Biljni materijal osušen je pomoću papirnatih ubrusa i potom prebačen u porculanski tarionik te usitnjen u tekućem dušiku. Određena je svježa masa usitnjenog tkiva i zatim prebačena u prethodno izvaganu kivetu. Tkivo je ekstrahirano tijekom 15 minuta na ledu dodatkom 1 ml hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM K₂ HPO₄, 0,1 M KH₂PO₄, pH 7 uz dodatak 0,1 mM EDTA i 1 % polivinil pirolidona (PVP). Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 20000 g pri temperaturi 4°C. Supernatant je odvojen u novu kivetu i korišten kao sirovi ekstrakt za određivanje koncentracije proteina.

Koncentracija proteina u uzorcima pripremljenim u prethodno opisanom postupku mjerena je spektrofotometrijskom metodom prema Bradfordu (1976). Ovaj postupak temelji se na brzom pomaku maksimuma apsorbancije, od 465 nm do 595 nm, koji se javlja u trenutku kada se boja Coomassie briljant plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue*), u kiselj otropini, veže na proteine. Pritom nastaje zeleno-smeđe do plavo obojenje. Smatra se da su za vezanje boje na proteine važne elektrostatske sile između sulfatnih grupa same boje i bazičnih aminokiselinskih ostataka u proteinima te hidrofobne interakcije s ostacima aromatskih aminokiselina. Zbog variranja koncentracija proteina koje se mjere u uzorcima, uvijek je potrebno napraviti standardnu krivulju s poznatim koncentracijama proteina (Ambriović Ristov i sur., 2007).

2.6.5. Određivanje malondialdehida

Količina malondialdehida određena je spektrofotometrijski metodom prema Heath i Packer (1968). Malondialdehid (MDA), nastao kao posljedica oksidacijskog stresa, reagira s tiobarbiturnom kiselinom, a nastalo crveno obojenje mjeri se spektrofotometrijski (Ambriović Ristov i sur., 2007). Za potrebe postupka određivanja MDA, biljni materijal osušen je pomoću papirnatih ubrusa i potom prebačen u porculanski tarionik te usitnjen u tekućem dušiku. Određena je svježa masa usitnjenog tkiva i zatim prebačena u prethodno izvaganu kivetu i stavljena na led. Potom je u plastične kivete dodano 1 ml 0,1 % TCA nakon čega je slijedilo centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 6000 g pri 4°C. U 500 µL supernatanta dodano je 1 mL 0,5 % tiobarbiturne kiseline (TBA)/10 % trikloroctene kiseline (TCA). Nakon miješanja sadržaja vorteksiranjem, dobivena smjesa zagrijavana je 30 minuta u vodenoj kupelji na 95°C, zatim brzo ohlađena u ledenoj kupelji i centrifugirana 15 min na 18000 g pri temperaturi od 4°C. Supernatant je izdvojen i izmjerena je apsorbancija pri 532

i 600 nm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteina, uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532}=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7. Statistička obrada podataka

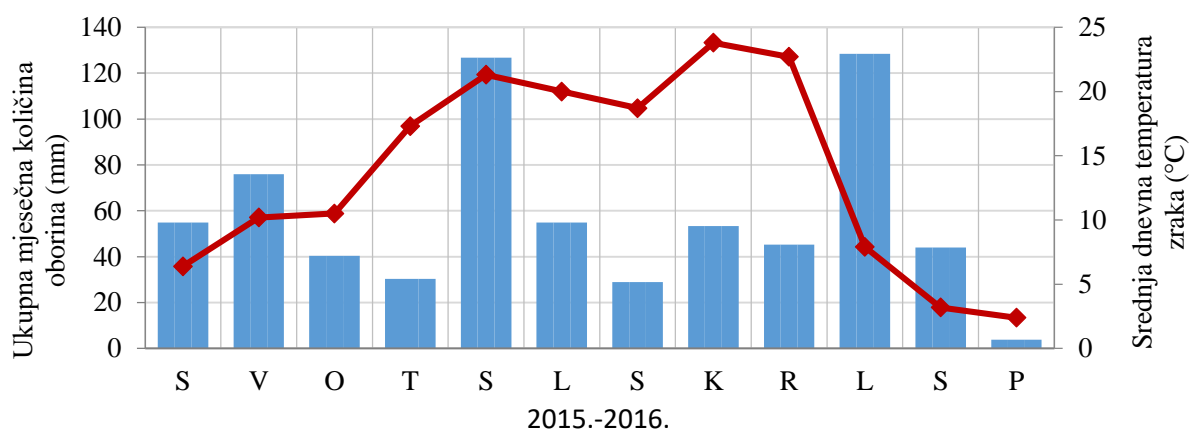
Statističke analize su napravljene u statističkom programu Statistica 64 13 (© 1984-2017 TIBCO Software Inc). Za usporedbu srednjih vrijednosti (ili medijana) dvije ili više skupina uzoraka korišteni su parametrijski i neparametersjki testovi. Slijede li uzorkovani podaci normalnu raspodjelu, provjereno je Shapiro-Wilk testom. Ukoliko je utvrđeno da ne slijede normalnu raspodjelu napravljena je log transformacija te ponovljena provjera Shapiro-Wilk testom. Jednosmjerna analiza varijance (one way ANOVA) korištena je za razlikovanje između postaja Odvodnog kanala Karašica prema mjerenim parametrima, a kao *post hoc* test korišten je Tukey HSD test. Kada podatci niti nakon transformacije nisu zadovoljavali uvjete normalne raspodjele, ili su bili nagnutih distribucija te su sadržavali vrijednosti koje su ili vrlo visoke ili vrlo niske (outlieri su u većini slučajeva bili s vrijednostima koje su neuobičajeno visoke), ali i zbog male veličine uzorka (npr. za mjerenja obavljena samo četiri puta godišnje) za statističku analizu podataka korišteni su neparametrijski testovi (neparametrijska verzija jednosmjerne ANOVA-e, Kruskal Wallis test), i to za usporedbu između postaja te za usporedbu između vremena uzorkovanja. Postoji li međusobna povezanost između pojedinih parametara u vodi Odvodnog kanala Karašica, utvrđeno je Spearman rank korelacijom jer je značajno manji utjecaj outlieria, te samim time daje realističniji uvid u procjeni korelacije između podataka (Reimann i sur., 2008). Razina značajnosti $p < 0,05$ primjenjena je u svim statističkim analizama.

3. Rezultati

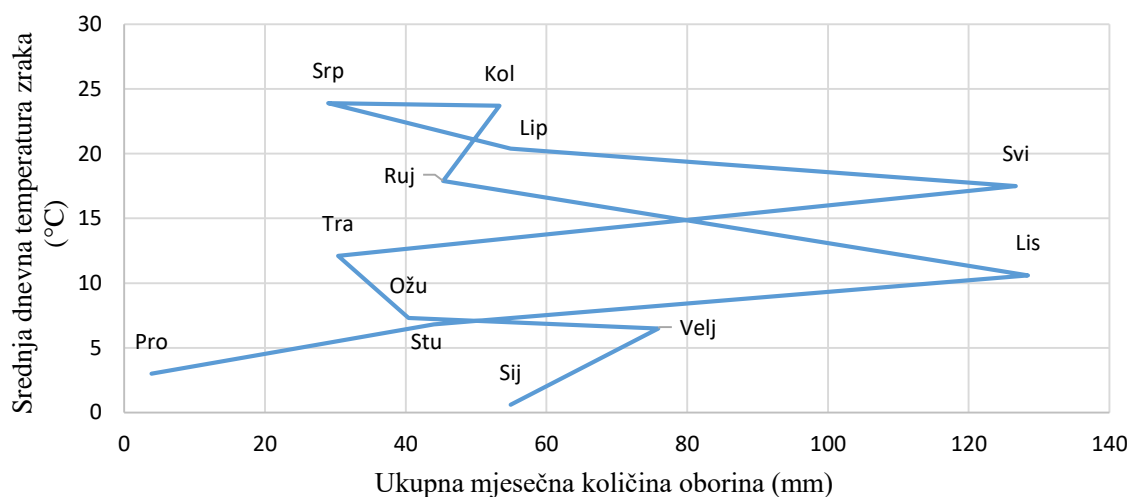
3.1. Fizikalno – kemijska svojstva vode i zraka

3.1.1. Ukupna mjesečna količina oborina i temperatura zraka

Klimatske karakteristike područja imaju veliki utjecaj na vodni režim, a najvažniji klimatski elementi su temperatura i padaline. Mjesečni hod oborine i srednja dnevna temperatura zraka za klimatološku postaju Beli Manastir tijekom istraživanog razdoblja prikazani su na slikama 8 i 9.



Slika 8. Ukupna mjesečna količina oborina i srednja dnevna temperatura zraka za postaju Beli Manastir u razdoblju od ožujka 2015. do veljače 2016. godine.



Slika 9. Srednja dnevna temperatura zraka i ukupna mjesečna količina oborina za postaju Beli Manastir u razdoblju od ožujka 2015. do veljače 2016. godine.

Minimum oborine (3,9 mm) zabilježen je u prosincu 2005. godine, kada je srednja dnevna temperatura zraka iznosila 2,4°C te dva maksimuma u svibnju (126,7 mm, srednja dnevna

temperatura zraka 21,3°C) i listopadu 2015. godine (128,4 mm, srednja dnevna temperatura zraka 7,9°C). Statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između padalina i vodostaja ($r = 0,22$; $p = 0,04$) te padalina i temperature vode ($r = 0,29$; $p = 0,007$) Odvodnog kanala Karašica. Negativna korelacija utvrđena je između padalina i alkaliteta-m ($r = -0,41$; $p = 0,000$), vodostaja i BPK₅ ($r = -0,29$; $p = 0,008$), vodostaja i BPK/KPK ($r = -0,35$; $p = 0,001$), vodostaja i specifične vodljivosti vode ($r = -0,50$; $p = 0,000$). Osim toga, negativne korelacije utvrđene su između padalina i ukupnog dušika, TN ($r = -0,27$; $p = 0,01$), PO₄ ($r = -0,27$; $p = 0,01$), SO₄ ($r = -0,28$; $p = 0,01$) i Na ($r = -0,30$; $p = 0,006$).

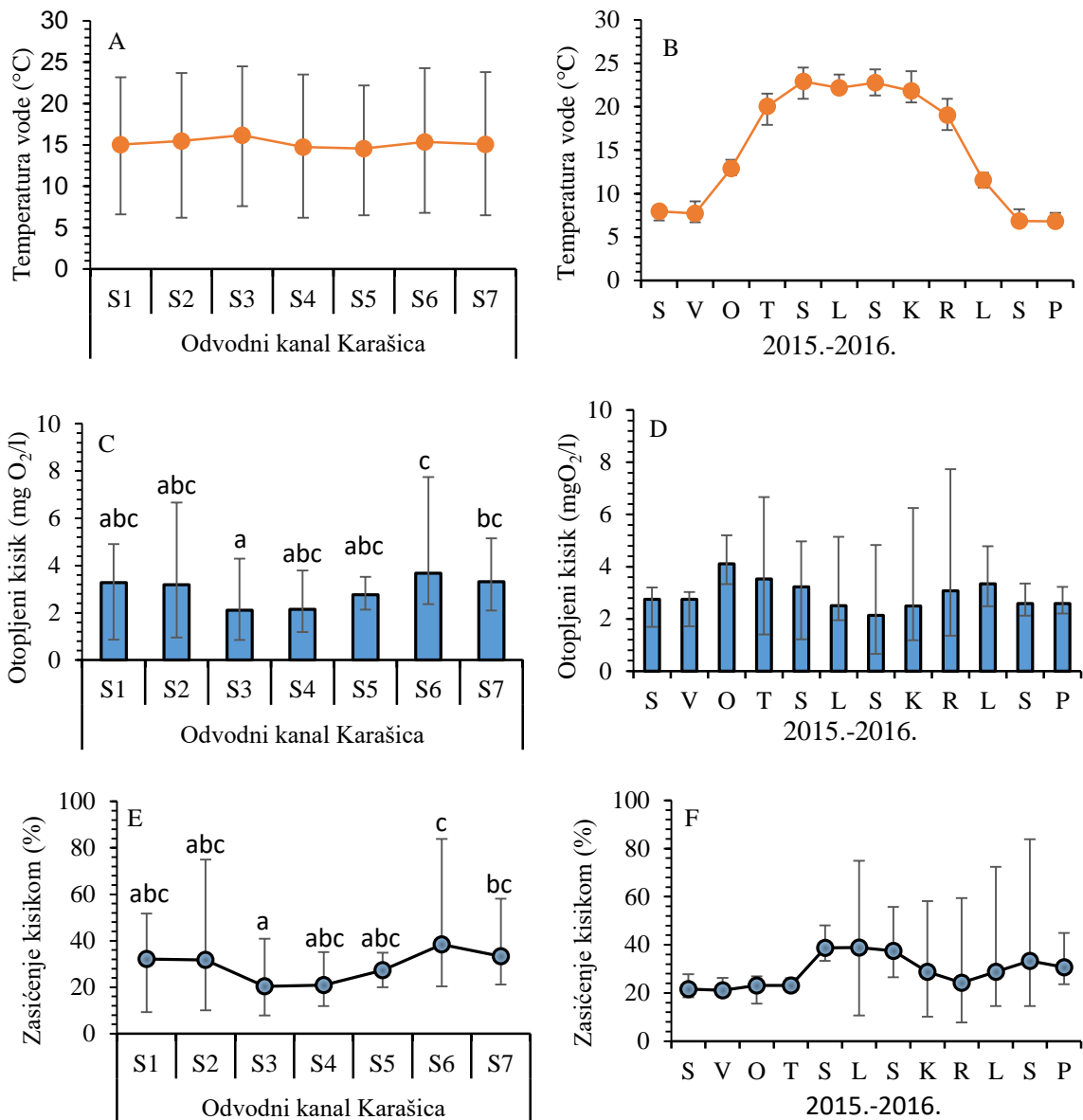
3.1.2. Temperatura vode i režim kisika Odvodnog kanala Karašica

Temperatura vode istraživanih postaja Odvodnog kanala Karašica varirala je od najniže (6,25°C) u studenom na postaji S4 i prosincu na postaji S2, do najviše (24,5° C) krajem svibnja 2015. godine na postaji S3. Srednja vrijednost temperature vode bila je najmanja (14,8°C) na postaji S4, a najveća (16,2°C) na postaji S3 (slika 9a A i B).

Najmanja koncentracija otopljenog kisika u vodi (0,82 mg/L) izmjerena je na postaji S3 u srpnju, a najveća (7,74 mg/L) na postaji S6 u rujnu 2015. godine. Srednja vrijednost otopljenog kisika bila je također najmanja (2,11 mg/L) na postaji S3, a najveća (3,67 mg/L) na postaji S6 (slika 9a C i D).

Zasićenje vode kisikom je relativna mjera koja pokazuje postotak kisika otopljenog u vodi u odnosu na normalnu topljivost pri određenoj temperaturi. Zasićenje vode kisikom bilo je najmanje (7,8%) na postaji S3 u rujnu, a najveće (83,8%) na postaji S6 u studenom 2015. godine. Na postaji S3 utvrđena je također najmanju (20,4%), a postaja S6 najveća (38,4%) srednja vrijednost zasićenja vode kisikom (slika 9a E i F).

Između postaja nije utvrđena statistički značajna razlika u temperaturi vode ($F_{6,77} = 0,06$, $p = 0,99$), dok je značajna razlika utvrđena između postaja u odnosu na otopljeni kisik u vodi ($F_{6,77} = 3,63$, $p = 0,0,03$).



Slika 9a. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost temperature vode (°C), koncentracije otopljenog kisika (mg O₂/L) i zasićenja vode kisikom Odvodnog kanala Karašica po postajama (A, C, E) i mjesecima (B, D, F) u razdoblju od ožujka do prosinca 2015. te siječnja i veljače 2016. godine. Ista slova uz navedene vrijednosti označavaju da nema statistički značajnih razlika (Tukey HSD, $p < 0.05$).

3.1.3. pH, alkalitet-m i specifična vodljivost vode Odvodnog kanala Karašica

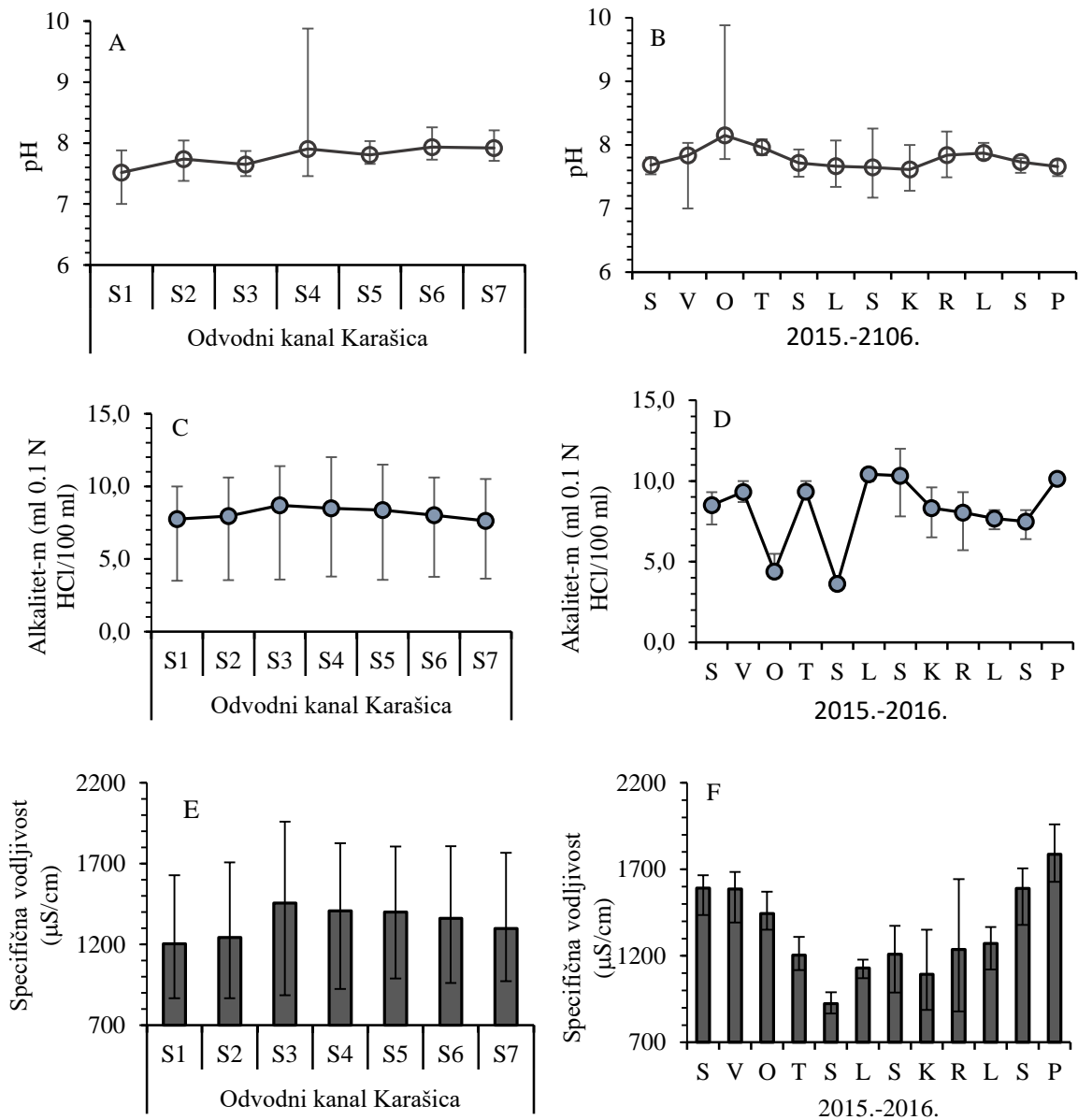
pH vode je mjera kiselosti otopine, a određuje se prema koncentraciji vodikovih (H⁺) iona. Većina jezera i tekućica ima pH između 6,5 do 8,5, a to su optimalni uvjeti za život većine biljnih i životinjskih vrsta. Prema vrijednostima pH koje su varirale od 7,0 na postaji S1 u veljači 2016. godine do 9,88 u ožujku 2015. godine sve mjerne postaje Odvodnog kanala

Karašica bile su u neutralnom do lužnatom području. Srednje vrijednosti pH bile su najmanje (7,5) na postaji S1, a jednake (7,9) na postajama S4, S6 i S7 (slika 10 A i B).

Alkalitet je mjera puferske sposobnosti, tj. sposobnosti vode da neutralizira dodanu kiselinu. Vrijednosti alkaliteta-m bile su minimalne (3,51 ml 0,1 N HCl/100 ml) na postaji S1 u svibnju, a maksimalne (12,00 ml 0,1 N HCl/100 ml) u srpnju 2015. godine. Srednja vrijednost alkaliteta-m bila je najmanja (7,62 ml 0,1 N HCl/100 ml) na postaji S7, a najveća (8,70 ml 0,1 N HCl/100 ml) na postaji S3, slika 10 C i D. Negativna korelacija između alkaliteta-m i padalina ($r = -0,412$; $p = 0,00$) ukazuje povezanost padalina i pH istraživanog vodotoka. Statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između alkaliteta-m i BPK₅ ($r = 0,522$; $p = 0,00$) te između alkaliteta-m i električne vodljivosti ($r = 0,478$; $p = 0,000$).

Specifična vodljivost indirektna je mjera za ukupnu količinu otopljenih tvari u vodi, ovisna je o temperaturi i stoga je kao pokazatelj korištena specifična vodljivost (SpecCond). Najmanja specifična vodljivost (867 $\mu\text{S}/\text{cm}$) izmjerena je u vodi postaje S1 u rujnu, a najveća (1960 $\mu\text{S}/\text{cm}$) na postaji S3 u prosincu 2015. godine. Najmanja srednja vrijednost specifične vodljivosti u istraživanom razdoblju i na istraživanim postajama bila je na postaji S1 (1204 $\mu\text{S}/\text{cm}$), a najveća (1457 $\mu\text{S}/\text{cm}$) na postaji S3, slika 10, E i F.

Između postaja nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima specifične vodljivosti ($F_{6,77} = 1,42$, $p = 0,22$), pH ($F_{6,77} = 1,18$, $p = 0,33$) i alkaliteta ($F_{6,77} = 0,26$, $p = 0,95$).

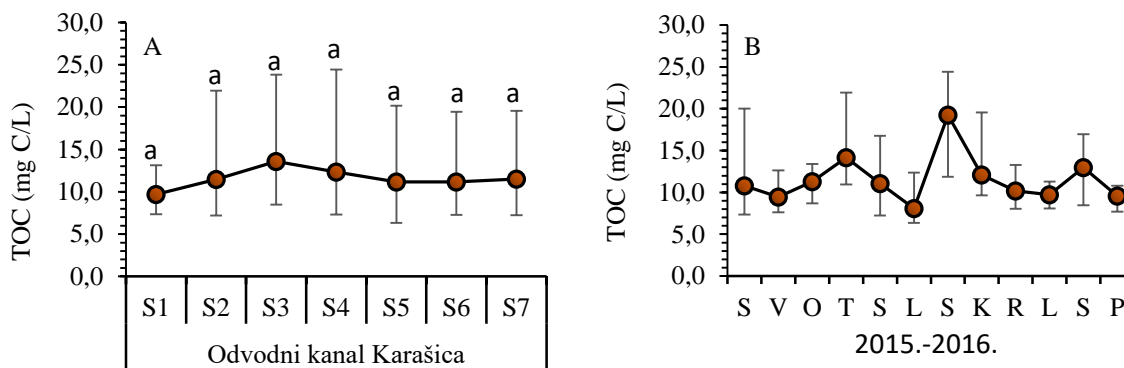


Slika 10. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost pH, specifična vodljivosti ($\mu\text{S}/\text{cm}$) i alkaliteta-m (ml 0.1 N HCl/100 ml) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A, C, E) i mjesecima (B, D, F) u razdoblju od ožujka do prosinca 2015. te siječnja i veljače 2016. godine.

3.1.4. Koncentracija ukupnog organskog ugljika u vodi Odvodnog kanala Karašica

Ukupni organski ugljik (TOC) predstavlja količinu ugljika vezanu u organskom spoju i koristi se kao nespecifični pokazatelj čistoće ili kakvoće vode. Na slici 11 A i B prikazane su koncentracije TOC u istraživanim uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica. Najmanje vrijednosti izmjerene su na postaji S1 (od 7,3 mg C/L u siječnju 2016. do 13,1 mg C/L u svibnju 2015.), a najveće na postajama S3 (od 8,5 u rujnu do 23,8 u srpnju 2015.) i S4 (od

7,3 u lipnju do 24,4 mg C/L u srpnju 2015). Između postaja nije utvrđena statistički značajna razlika ($F_{6,77} = 1,18$, $p = 0,33$). Osim toga, značajna negativna korelacija između TOC i DO ($r = -0,27$, $p = 0,013$), te pozitivne korelacije između TOC i KPK ($r = 0,45$, $p = 0,000$) te TOC i BPK5 ($r = 0,41$, $p = 0,000$) ukazuju na veliku potrošnju kisika za razgradnju organske tvari.



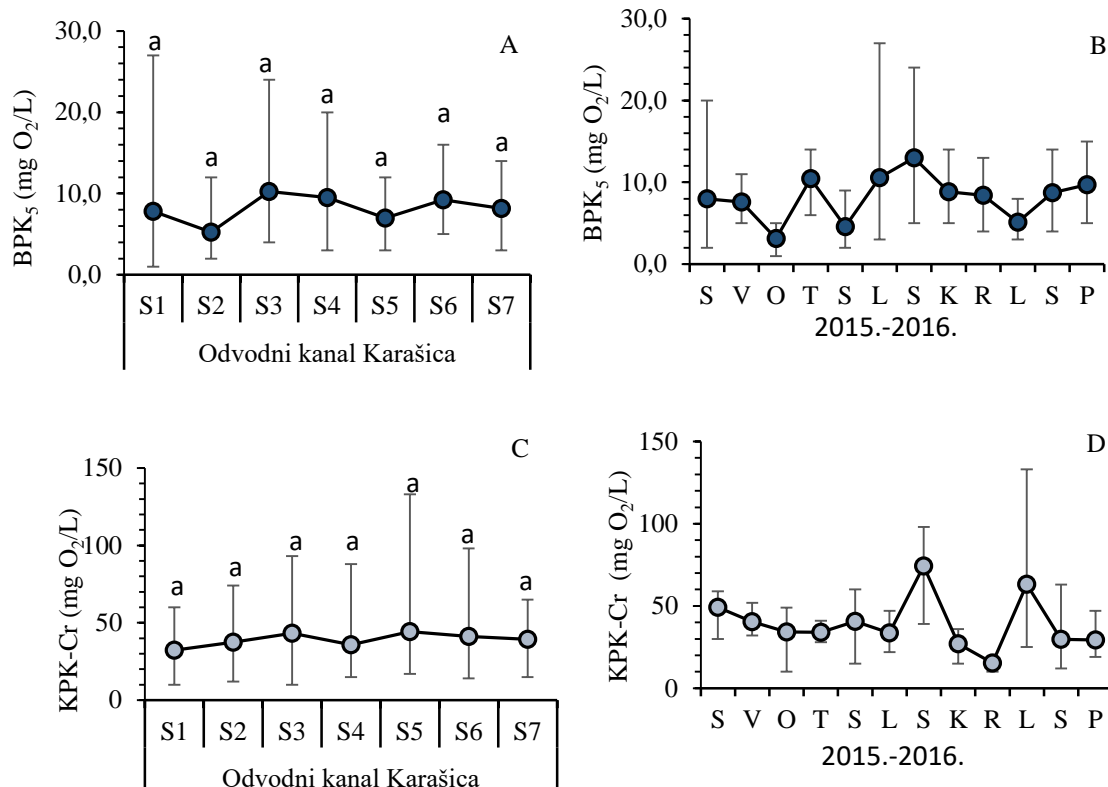
Slika 11. Minimalne, maksimalne i srednje vrijednosti koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC, mg C/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A) i mjesecima (B) u razdoblju uzorkovanja od ožujka 2015. do veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

3.1.5. Biološka i kemijska potrošnja kisika u vodi Odvodnog kanala Karašica

Osnovni pokazatelji prisutnosti organskog onečišćenja koje se može razgraditi u površinskim kopnenim vodama su biološka potrošnja kisika (BPK₅) i kemijska potrošnja kisika (KPK). Biološka potrošnja kisika (BPK₅, izraženo kao mg O₂/L) izražava se kao količina kisika potrebna za oksidaciju organskog ugljika i dijelom organskog dušika, a time neizravno i organske tvari, te je jedna od najstarijih metoda za ocjenu organskog onečišćenja. Kemijska potrošnja kisika (KPK) predstavlja utrošak K₂Cr₂O₇ potrebnog za oksidaciju organske tvari u vodi izražen u mg O₂/L.

Srednje vrijednosti BPK₅ iznosile su od 5,3 na postaji S2 do 10,3 mg O₂/L na postaji S3. Najmanja vrijednost BPK₅ (1 mg O₂/L) u ožujku 2015. godine i najveća vrijednost (27 mg O₂/L) u lipnju 2015. godine izmjerene su na postaji S1, slika 12 A i B.

Najmanje vrijednosti KPK-Cr utvrđene su na postaji S1 (od 10 mg O₂/L u ožujku do 60 u svibnju 2015. godine, srednja vrijednost 32 mg O₂/L), a najveće na postaji S5 (od 17 mg O₂/L rujnu do 133 u listopadu 2015. godine, srednja vrijednost 44 mg O₂/L), slika 12 C i D.



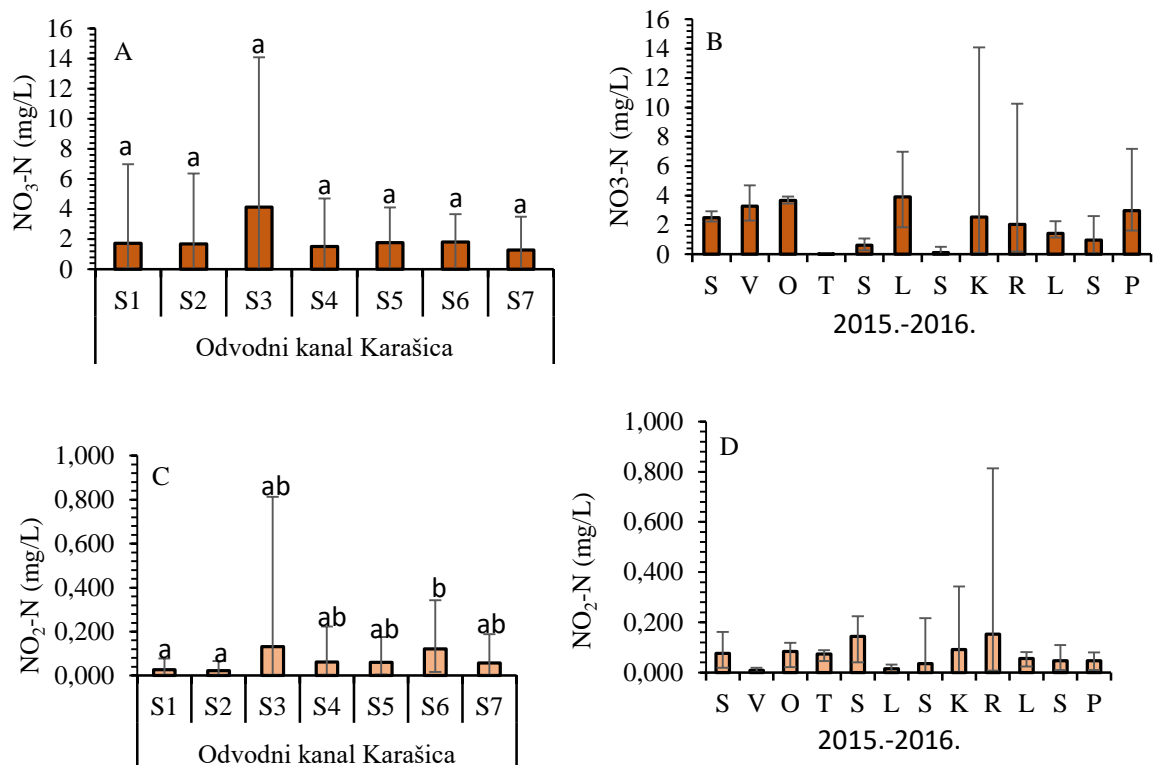
Slika 12. Minimalne, maksimalne i srednje vrijednosti biološke potrošnje kisika (BPK₅, mg O₂/L) i kemijske potrošnje kisika (KPK-Cr, mg O₂/L) u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica po postajama (A i C) i mjesecima (B i D) u razdoblju uzorkovanja od ožujka 2015. do veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

3.1.6. Koncentracija dušika i fosfora

Među hranjivim tvarima, dušik i fosfor bili su zastupljeni u različitim koncentracijama, ovisno o vremenu uzorkovanja i istraživanoj postaji (slike 13-15). Dušik se u obliku nitrita (NO₂-N) pojavljuje kao prijelazno stanje u biološkoj razgradnji spojeva koji sadrže organski dušik. Na istraživanim postajama nitriti su se nalazili u vrlo malim količinama (slika 13 C i D), jer lako oksidiraju u nitrate. Koncentracija nitrata varirala je na postaji S3 od 0,0030 mg/L u travnju do 14,0870 mg/L u kolovozu 2015. godine. Srednja vrijednost nitrata bila je također najveća (4,1413 mg/L) na postaji S3, a najmanja (1,2913 mg/L) na postaji S7 Odvodnog kanala Karašica, međutim prema vrijednostima nitrata nisu postojale statistički značajne razlike između postaja (slika 13 A i B).

Najmanja koncentracija nitrita, (0,0017 mg/L) izmjerena je u srpnju 2015. godine na postaji S2, gdje je i srednja vrijednost koncentracije nitrita za istraživano razdoblje bila najmanja

(0.0220 mg/L). Suprotno tome, najveća koncentracija nitrita (0.8130 mg/L) utvrđena u rujnu 2015. godine na postaji S3 gdje je i srednja vrijednost bila najveća (0,1319 mg/L).



Slika 13. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost nitrata (NO₃-N, mg/L) i nitrita NO₂-N (mg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A i C) i mjesecima (B i D) u razdoblju od ožujka do prosinca 2015. te siječnja i veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu (p<0,05).

Najveća koncentracija amonij-N (4,8800 mg/L) utvrđena je u kolovozu 2015. godine na postaji S4, gdje je i srednja vrijednost (1.6347 mg/L) za istraživano razdoblje bila najveća. Koncentracija amonij-N iona iona bila je najmanja (0.100 mg/L) na postaji S1 u listopadu 2015. godine, dok je srednja vrijednost amonij-N u istraživanom razdoblju bila najmanja (0,1190 mg/L) na postaji S2, slika 14 A i B.

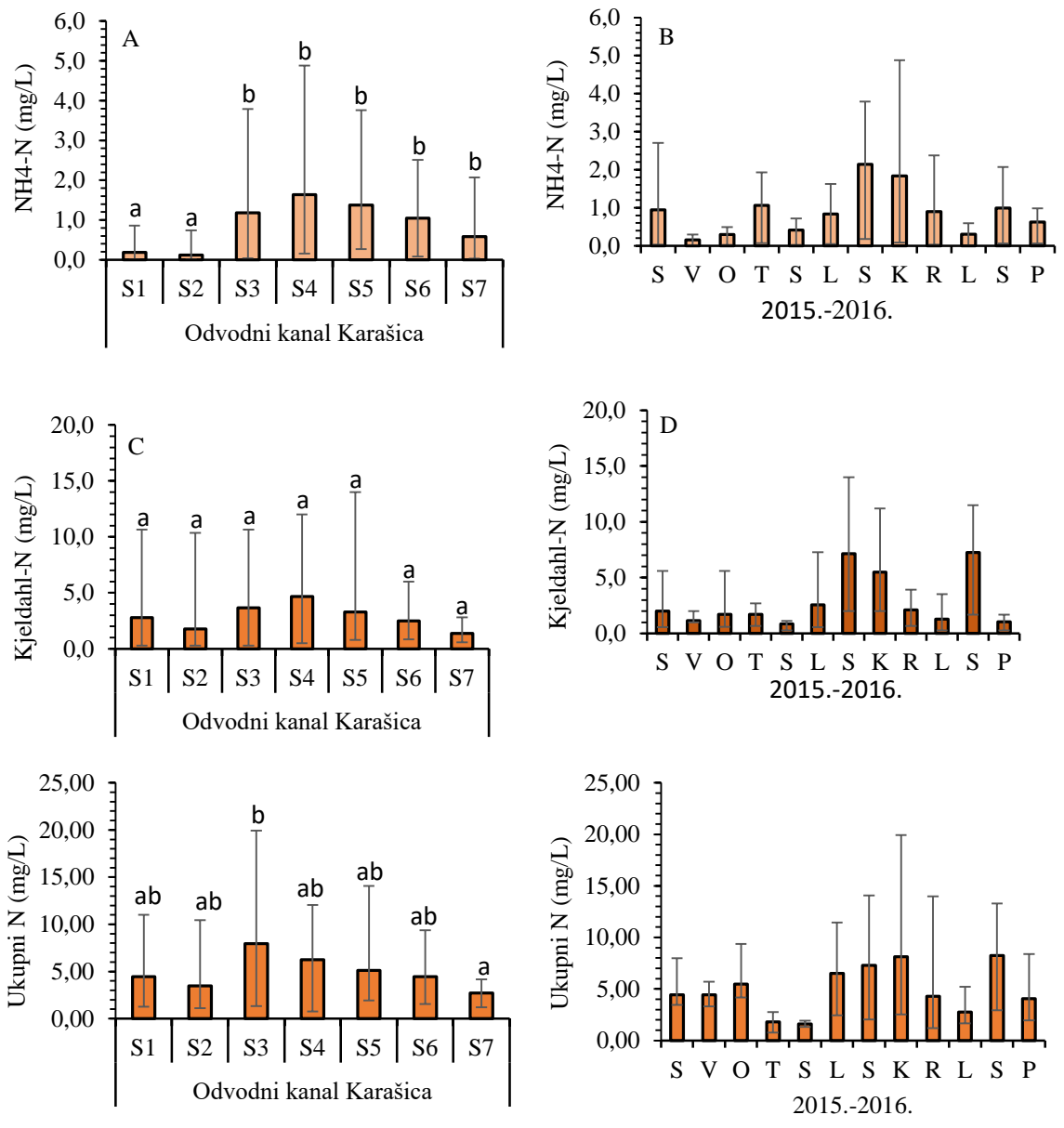
Koncentracija Kjeldahl dušika (organski i amonij-N) u vodi ukazuje na dušik prisutan u bjelančevinama i nekim drugim organskim spojevima. Najveća koncentracija Kjeldahl-N (14,000 mg/L) izmjerena je na postaji S5 u srpnju 2015. godine, dok su najmanje vrijednosti (0,2800 mg/L) utvrđene na postaji S3 u listopadu, a na postajama S1 i S2 u prosincu 2015. godine. Iako je najveća srednja vrijednost (4,6594 mg/L) Kjeldahl-N utvrđena je na postaji

S4, a najmanja (1,3634 mg/L) na postaji S7, istraživane postaje se nisu međusobno značajno razlikovale (slika 14, C i D).

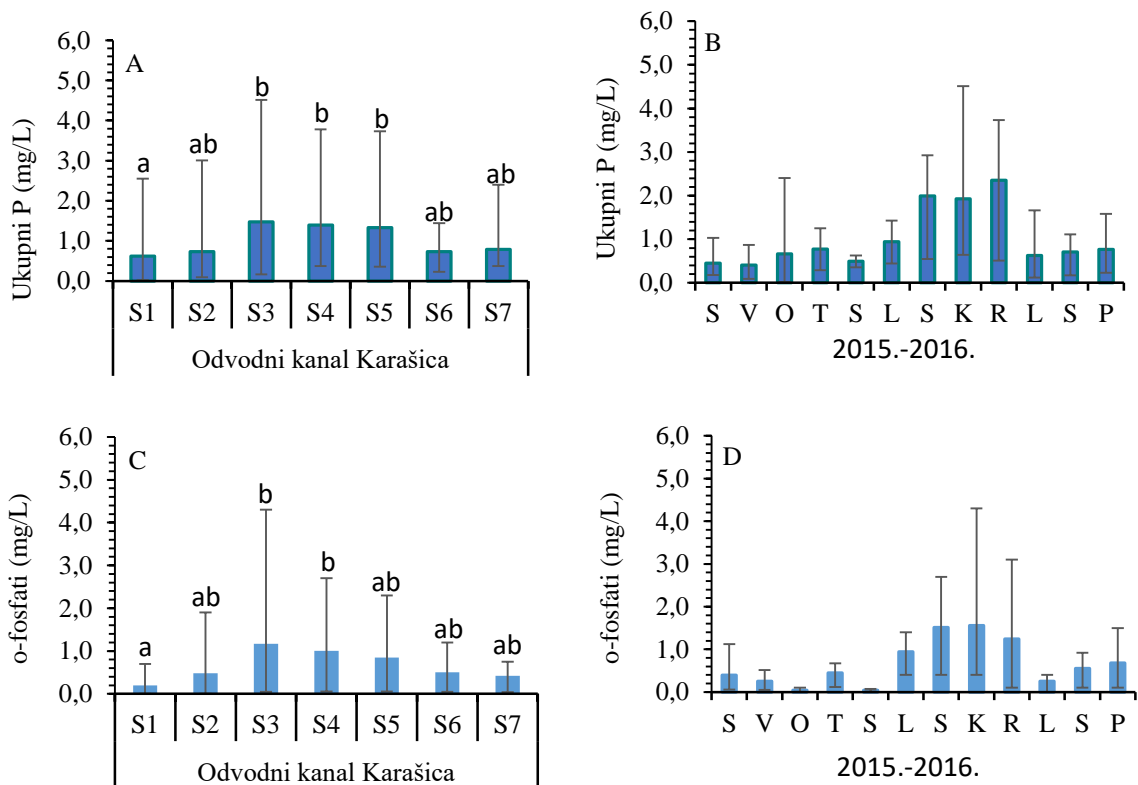
Ukupni dušik predstavlja zbroj ukupnog Kjeldahl-N (organski i amonij-N), nitrita i nitrata. Koncentracija ukupnog dušika također je bila najveća (14,000 mg/L) na postaji S5, a izmjerena je u ožujku 2015. godine, dok su najmanje i jednake vrijednosti (0,2800 mg/L) izmjerene na postajama S1 i S2 u kolovozu, a na postaji S3 u lipnju 2015. godine. Raspon srednjih vrijednosti ukupnog dušika za istraživano razdoblje iznosio je od 1,8026 mg/L (S7) do 6,4166 mg/L (S3), slika 14 E i F.

Na postaji Beli Manastir (S3), nizvodno od ispusta komunalnih otpadnih voda izmjerena je najveća koncentracija ukupnog fosfora, TP (4,5116 mg/L) u kolovozu 2015. godine, kao i najveća srednja vrijednost (1,4773 mg/L) ukupnog fosfora u istraživanom razdoblju. S druge strane, kod hrvatsko-mađarske granice u blizini mjesta Luč (S1), zabilježena je u ožujku najmanja koncentracija (0,0201 mg/L) TP, a na postaji S1 utvrđena je i najmanja srednja vrijednost (0,6165 mg/L) TP, slika 15 A i B. Prema koncentracijama TP postaja S1 značajno se razlikovala od postaja S3, S4 i S5 ($p < 0,05$).

Vrijednosti ortofosfata bile su također maksimalne (4,300 mg/L) u kolovozu na postaji S3, gdje je i srednja vrijednost za istraživano razdoblje bila najveća (1,1696 mg/L). Suprotno tome, na postajama S1 i S2 nisu izmjereni o-fosfati u listopadu (0,000 mg/L), a najmanja (0,1995 mg/L) srednja vrijednost o-fosfata bila je na postaji S1, slika 15 C i D.



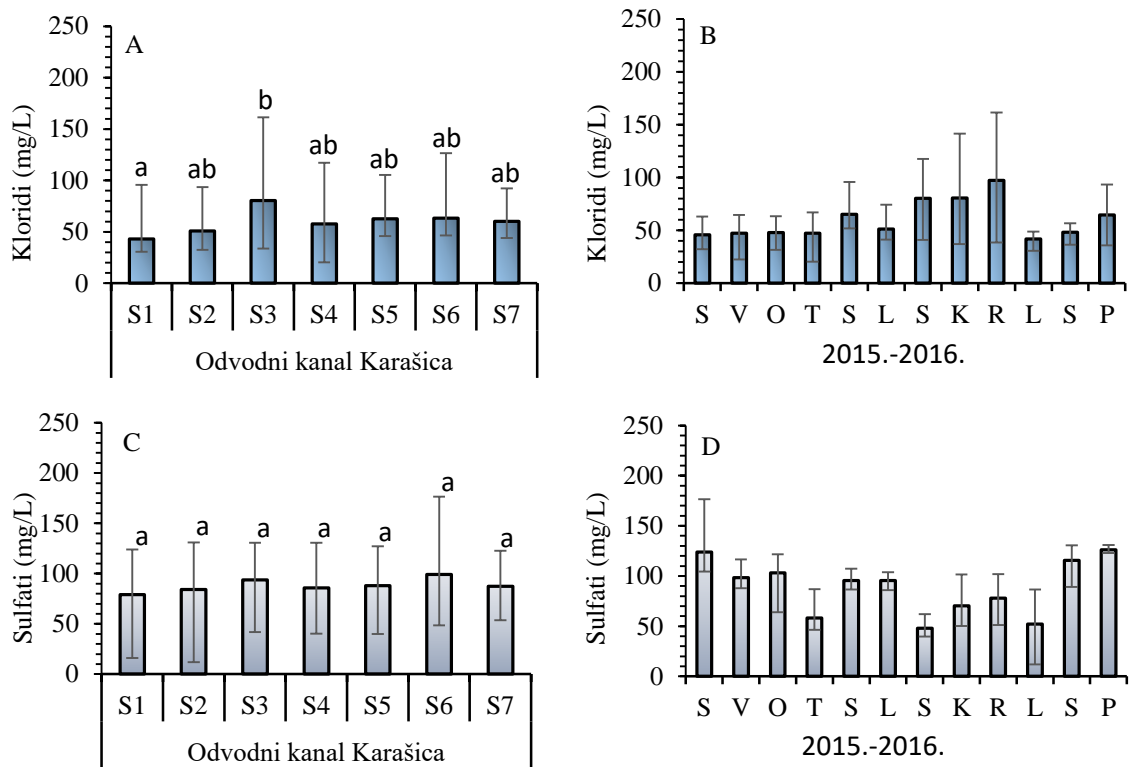
Slika 14. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost amonij-N, Kjeldahl-N i ukupnog N (mg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A, C, E) i mjesecima (B, D, F) u razdoblju od ožujka do prosinca 2015. te siječnja i veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).



Slika 15. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost ukupnog P i o-fosfata (mg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A i C) i mjesecima (B i D) u razdoblju od ožujka do prosinca 2015. te siječnja i veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

3.1.7. Koncentracija klorida i sulfata

Sulfate u vodi nalazimo najčešće u obliku magnezijeva sulfata, kalcijeva sulfata ili natrijeva sulfata. Najveća koncentracija sulfata (176,500 mg/L) izmjerena je u siječnju 2016. godine na postaji S6 gdje je utvrđena i najveća srednja vrijednost (99,0481 mg/L) u istraživanom razdoblju. Najmanja vrijednost sulfata (11,8100 mg/L) izmjerena je na postaji S2 u listopadu 2015. godine, dok je najmanja srednja vrijednost sulfata (79,1024 mg/L) utvrđena na postaji S1, ali raspon koncentracija sulfata na mjernim postajama nije bio velik, što je vidljivo na slici 16 C i D. Koncentracija klorida bila je maksimalna (161,510 mg/L) u rujnu na postaji S3, a minimalna (20,460 mg/L) u travnju na postaji S4 2015. godine. Srednja vrijednost klorida bila je najmanja (42,930 mg/L) na postaji S1, a najveća (80,3467 mg/L) na postaji S3, slika 16 A i B.



Slika 16. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost klorida (mg/L) i sulfata (mg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A i C) i mjesecima (B i D) u razdoblju od ožujka do prosinca 2015. te siječnja i veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

3.1.8. Koncentracija natrija, kalija, kalcija i magnezija

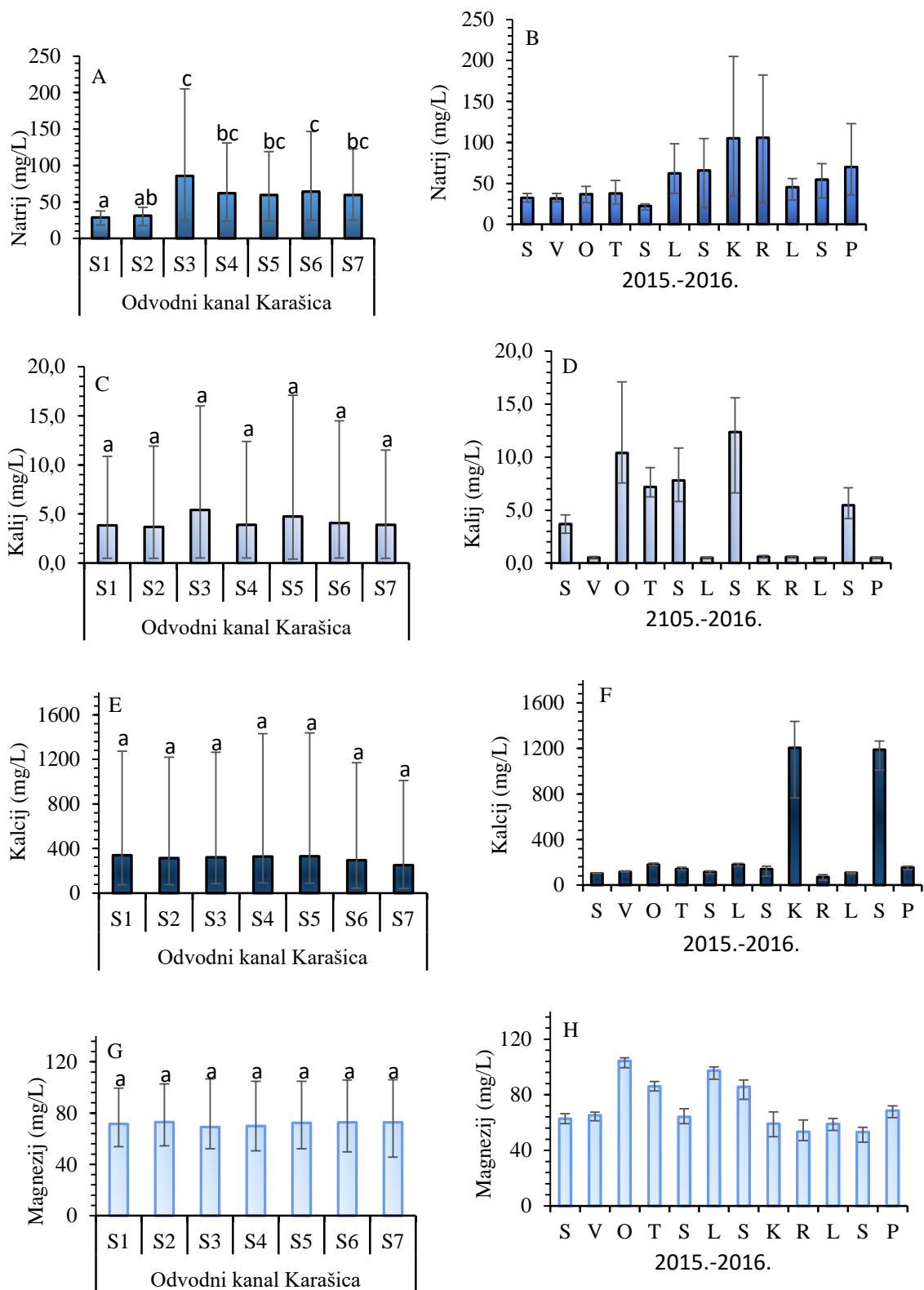
Koncentracija natrija u Odvodnom kanalu Karašica bila je najveća (205,00 mg/L) u kolovozu na postaji S3 gdje je utvrđena i najveća srednja vrijednost natrija za istraživano razdoblje. Najmanja koncentracija natrija (17,750 mg/L) izmjerena je na postaji S2 u svibnju 2015. godine. Najmanja srednja vrijednost natrija (28,5527 mg/L) utvrđena je na postaji S1 (slika 17 A i B).

Na postaji S5 utvrđena je minimalna koncentracija kalija (0,396 mg/L) u veljači 2016. i maksimalna koncentracija kalija (17,090 mg/L) u ožujku 2015. godine. Srednja vrijednost kalija u vodi istraživane dionice kanala bila je najveća (5,4045 mg/L) na postaji S3, a najmanja (3,6719 mg/L) na postaji S2 (slika 17 C i D).

Najveća koncentracija kalcija (1438,00 mg/L) izmjerena je na postaji S5 Odvodnog kanala Karašica u Baranji tijekom kolovoza 2015. godine, a najmanja (42,200 mg/L) u rujnu na postaji S7. Na postaji S7 utvrđena je i najmanja srednja vrijednost (249,6917 mg/L) kalcija

za istraživano razdoblje i istraživane postaje. Najveća srednja vrijednost kalcija (339,0727 mg/L) bila je na postaji S1, slika 17 E i F.

Najveća koncentracija magnezija (106,700 mg/L) izmjerena je na postaji S3 Odvodnog kanala Karašica u ožujku, a najmanja (45,800 mg/L) na postaji S7 u studenom 2015. godine. Najveća srednja vrijednost magnezija (73,0942 mg/L) izmjerena je u istraživanom razdoblju na postaji S2, a najmanja (69,2233 mg/L) na postaji S3, slika 17 G i H.



Slika 17. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost natrija (mg/L), kalija (mg/L), kalcija (mg/L) i magnezija (mg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A, C, E, G) i mjesecima (B, D, F, H) tijekom 2015. te siječnja i veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

3.2. Mikrobiološki pokazatelji onečišćenja u vodi Odvodnog kanala Karašica

Najveća vrijednost fekalnih koliforma (130000 cfu/100 ml) bila je na postaji S6 u studenom 2015. godine, a najmanja (10 cfu/100 ml) na postaji S1 u veljači 2016. godine. Vrlo visoka koncentracija fekalnih koliforma (100000 cfu/100 ml) izmjerena je i na postaji S7 u studenom 2015. godine. Srednje vrijednosti fekalnih koliforma bile su također najveće (32945 cfu/100 ml) na postaji S6, a zatim S7 (25200 cfu/100 ml), dok je najmanja srednja vrijednost (90 cfu/100 ml) utvrđena na postaji S1 (tablica 4).

Najveće vrijednosti *E. coli* (120000 cfu/100 ml) utvrđene su na postaji S6 u studenom 2015. godine, a najmanje (1 cfu/100 ml) na postaji S1 u veljači 2016. godine. Najveća srednja vrijednost (30402,5 cfu/100 ml) *E. coli* bila je na postaji S6, a najmanja (37,75 cfu/100 ml) na postaji S1.

Maksimalne vrijednosti enterokoka (37000 cfu/100 ml) utvrđene su u studenom 2015. godine na postaji S6, međutim visoka vrijednost kolonija enterokoka nađena je i na postaji S7 (tablica 4). Na postaji S6 nađene su i minimalne vrijednosti enterokoka (30 cfu/100 ml) u rujnu 2015. godine. Najveća srednja vrijednost (9312,5 cfu/100 ml) također je bila na postaji S6, a najmanja (110 cfu/100 ml) na postaji S1.

Statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između TOC i FC ($r = 0,62$, $p=0,000$), TOC i FS ($0,65$, $p=0,000$) te TOC i *E. coli* ($r=0,59$, $p=0,001$).

Tablica 4. Vrijednosti fekalnih koliforma, *E. coli* i fekalnih streptokoka (cfu/100 ml) u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica po postajama i mjesecima u svibnju, rujnu i studenom 2015. te veljači 2016. godine.

Postaja	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Fekalni koliformi, FC (cfu/100 ml)							
Svibanj 2015.	20	50	45000	6600	910	650	380
Rujan 2015.	250	700	420	220	940	130	50
Studeni 2015.	80	180	12000	16000	1200	130000	100000
Veljača 2016.	10	20	2000	1000	2000	1000	370
Escherichia coli (cfu/100 ml)							
Svibanj 2015.	20	30	40000	5200	710	500	250
Rujan 2015.	50	60	270	70	640	110	50
Studeni 2015.	80	180	8600	4100	9000	120000	80000
Veljača 2016.	1	5	2000	1000	2000	1000	350
Fekalni streptokoki, FS (cfu/100 ml)							
Svibanj 2015.	70	60	6000	600	320	90	70
Rujan 2015.	150	130	90	160	1200	30	100
Studeni 2015.	100	230	2000	4400	1200	37000	33000
Veljača 2016.	120	40	180	400	340	130	130

3.3. Specifične onečišćujuće tvari u vodi Odvodnog kanala Karašica

3.3.1. Koncentracija metala (bakar, željezo, cink, olovo i kadmij)

Na slici 18 A-F prikazane su maksimalne, minimalne i srednje vrijednosti bakra, željeza i cinka po postojama Odvodnog kanala Karašica mjerenih u svibnju, rujnu i studenom 2015. te veljači 2016. godine. Raspon koncentracija bakra bio je od 0,75 µg/L na postaji S3 u studenom do 3,79 µg/L na postaji S4 u rujnu 2015. godine. Najmanja srednja vrijednost koncentracije Cu (1,505 µg/L) imala je postaja S3, a najveću srednju vrijednost (2,075 µg/L) postaja S2, slika 18 A i B.

Najmanja koncentracija željeza ($0,04 \mu\text{g/L}$) izmjerena je u svibnju na postaji S5, a najveća ($0,410 \mu\text{g/L}$) u rujnu 2015. godine na postaji S4. Prosječna vrijednost koncentracije Fe u vodi Odvodnog kanala Karašica bila je najmanja ($0,102 \mu\text{g/L}$) na postaji S7, a najveća ($0,246 \mu\text{g/L}$) na postaji S1, slika 18 C i D.

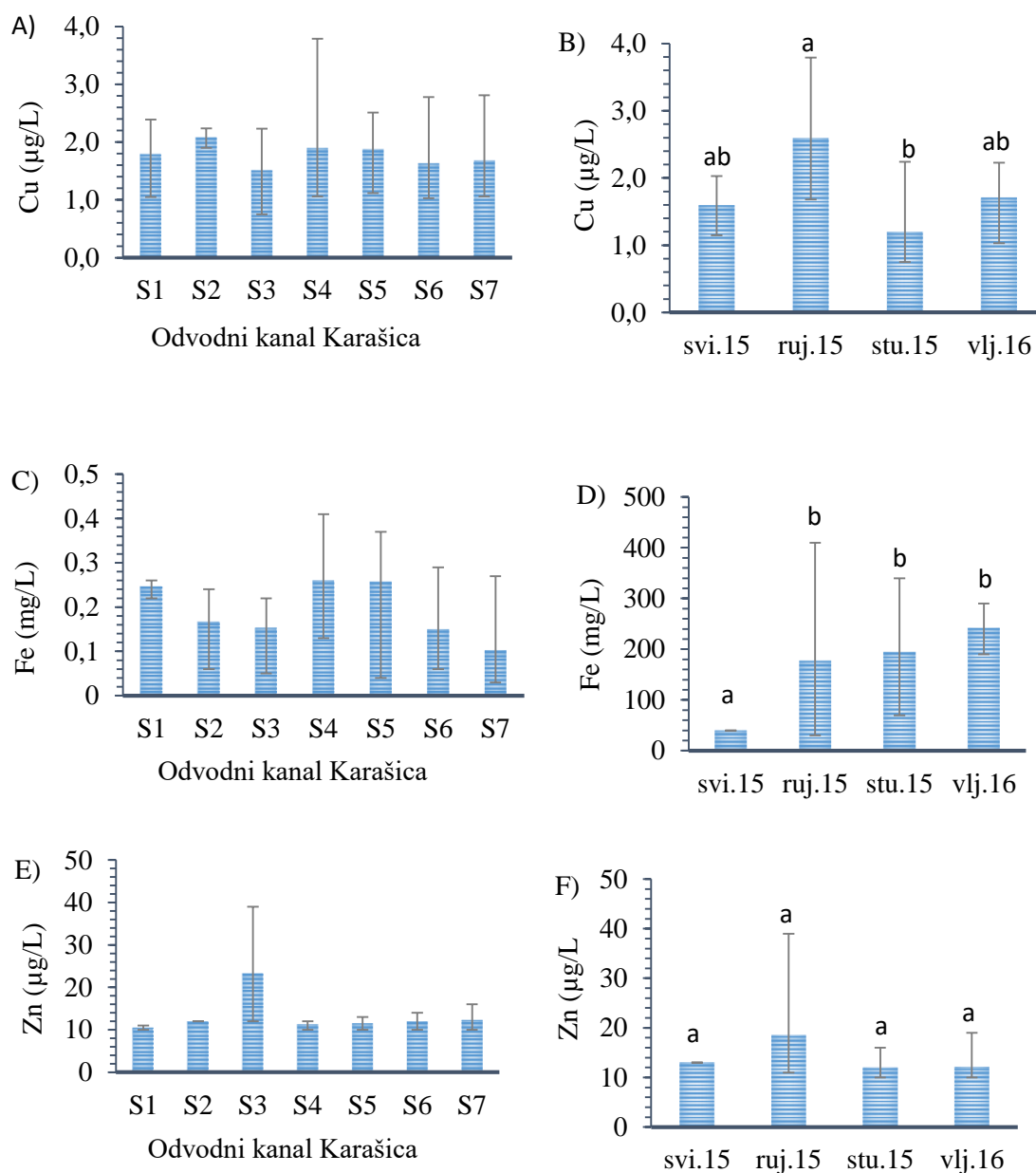
Koncentracija cinka bila je najmanja ($10,00 \mu\text{g/L}$), odnosno jednaka na postajama S1 te S4 do S7 u studenom 2015. i veljači 2016. godine, a najveća ($39,00 \mu\text{g/L}$) na postaji S3 u rujnu 2015. godine. Najmanja srednja vrijednost cinka ($10,50 \mu\text{g/L}$) izmjerena je u vodi postaje S1, a najveća ($23,33 \mu\text{g/L}$) na postaji S3, slika 18 E i F.

Što se tiče mjerenja koncentracija kadmija i olova, kadmij je samo u dva mjerenja prešao granicu detekcije metode i to u uzorcima vode postaje S3 ($0,05 \mu\text{g/l}$) i S6 ($0,06 \mu\text{g/l}$) u rujnu 2015. godine. Koncentracija olova je u svim uzorcima bilo ispod granice detekcije metode, odnosno $< 2 \mu\text{g/l}$.

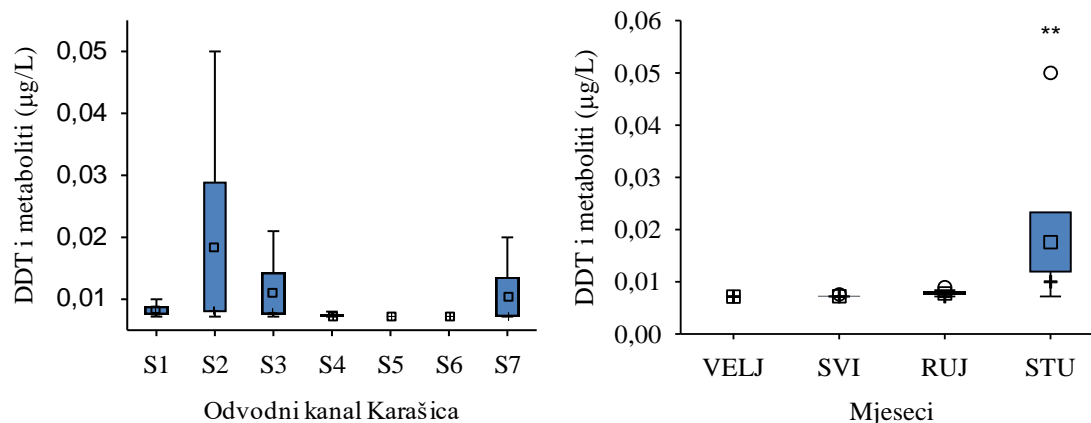
Statistička analiza je pokazala da između istraživanih postaja nema značajne razlike u koncentracijama ispitivanih metala (Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks, $p > 0,05$), no razlika je utvrđena između vremena uzorkovanja za Cu (Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks, $H_{3,28} = 14,1$; $p = 0,003$) i Fe ($H_{3,28} = 13,8$; $p = 0,003$), slika 18 B i D.

3.3.2. DDT i metaboliti te ciklodienski pesticidi

DDT-a (1,1,1-triklor-2,2-di 4-klorfenil)etan) i metaboliti izmjereni su u svibnju, rujnu i studenom 2015. godine samo na postaji S2, s najvećim vrijednostima ($0,05 \mu\text{g/L}$). Na postaji S1 DDT i metaboliti izmjereni su u rujnu i studenom, kao i na postaji S3, dok su na postajama S4 i S7 vrijednosti DDT-a izmjerene samo u studenom 2015. godine. U veljači 2016. godine DDT i metaboliti nisu utvrđeni. Srednja vrijednost bila je za istraživane mjesece i istraživano razdoblje najveća ($0,0222 \mu\text{g/L}$) na postaji S2, dok na postajama S5 i S6 DDT i metaboliti su bili ispod razine detekcije metode, slika 19 A i B.

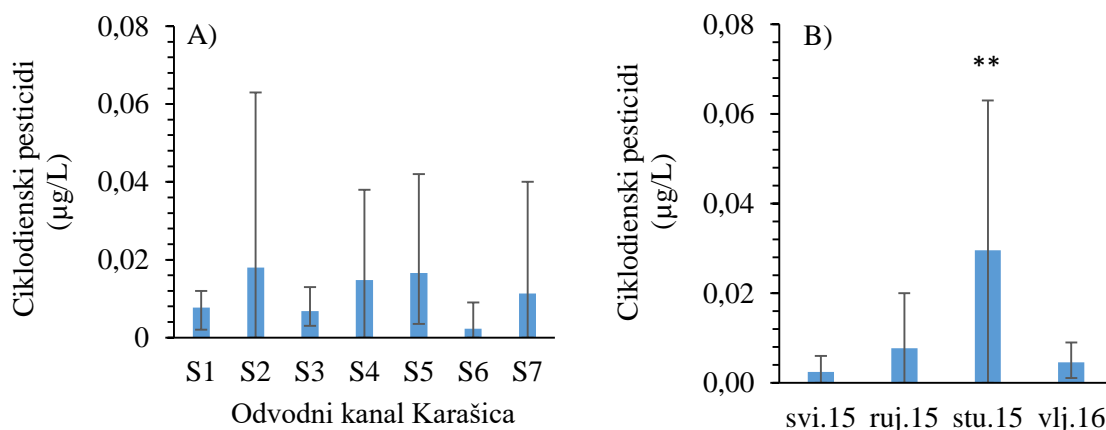


Slika 18. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost bakra ($\mu\text{g/L}$), željeza (mg/L) i cinka ($\mu\text{g/L}$) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A, C, E) i mjesecima (B, D, F) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike (Kruskal-Wallis test, Multiple Comparisons p values (2-tailed), $p < 0,05$).



Slika 19. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost DDT-a i metabolita ($\mu\text{g/L}$) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A) i mjesecima (B) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. ** označava statistički značajnu razliku od ostalih mjeseci (Kruskal-Wallis test, Multiple Comparisons p values (2-tailed), $p < 0,05$).

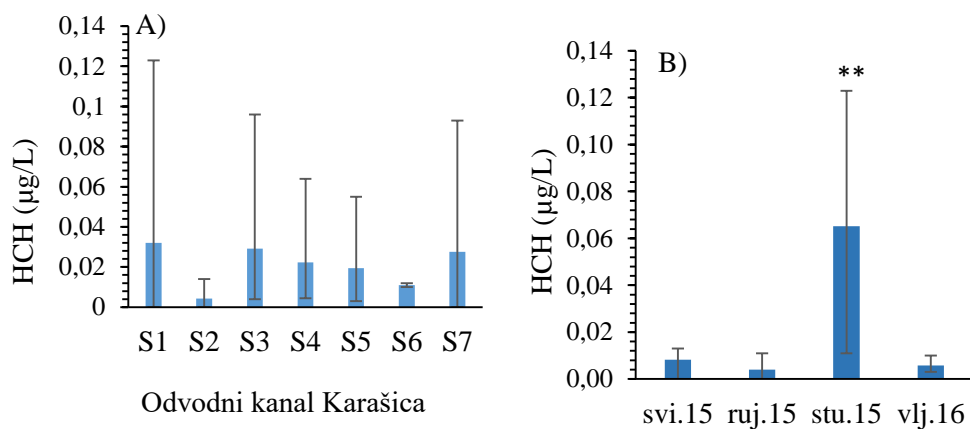
Koncentracija ciklodienskih pesticida (aldrin, dieldrin, endrin, heptaklor i endosulfan ukupni) bila je najveća ($0,0630 \mu\text{g/L}$) u studenom 2015. godine, dok su na postajama S2, S4, S6 i S7 koncentracije bile u svibnju, rujnu i studenom 2015. ispod granice detekcije. Srednja vrijednost ciklodienskih pesticida bila je najveća ($0,01797 \mu\text{g/L}$) na postaji S2, a najmanja ($0,00225 \text{ mg/L}$) na postaji S6, slika 20 A i B.



Slika 20. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost ciklodienskih pesticida ($\mu\text{g/L}$) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A) i mjesecima (B) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. ** označava statistički značajnu razliku od ostalih mjeseci (Kruskal-Wallis test, Multiple Comparisons p values (2-tailed), $p < 0,05$).

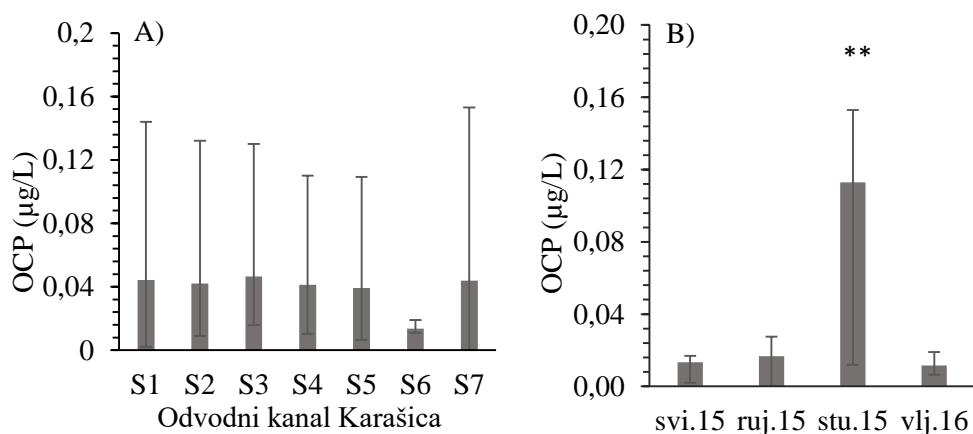
Koncentracija heksaklorcikloheksana, odnosno zbroj svih izomera HCH bio je najveći ($0,123 \mu\text{g/L}$) u studenom 2015. godine na postaji S1. U svibnju i rujnu 2015. te veljači 2016.

godine HCH vrijednosti nisu izmjerene na postajama S1, S2 i S7. Srednja vrijednost HCH bila je najveća (0,032 µg/L) na postaji S1, a najmanja (0,00425 µg/L) na postaji S2, slika 21 A i B.



Slika 21. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost heksaklorcikloheksana, HCH (µg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A) i mjesecima (B) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. ** označava statistički značajnu razliku od ostalih mjeseci (Kruskal-Wallis test, Multiple Comparisons p values (2-tailed), $p < 0,05$)

Najveća koncentracija organoklorovih pesticida, OCP, (0,1530 µg/L) utvrđena je u studenom 2015. godine na postaji S7, a najmanja (0,0020 µg/L) u svibnju 2015. godine na postaji S1. Prema srednjim vrijednostima OCP-a na sedam istraživanih postaja Odvodnog kanala Karašica, najmanju srednju vrijednost OCP-a imala je postaja S6 (0,0135 µg/L), a najveću (0,0465 µg/L) postaja S3, slika 22 A i B.



Slika 22. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost organoklorovih pesticida (OCP, µg/L) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A) i mjesecima (B) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. ** označava statistički značajnu razliku od ostalih mjeseci (Kruskal-Wallis test, Multiple Comparisons p values (2-tailed), $p < 0,05$).

Tablica 5. Rezultati Kruskal Wallis ANOVA. Usporedba uzoraka vode Odvodnog kanala Karašica prema specifičnim onečišćujućim tvarima između postaja (S1 – S7) i vremena uzorkovanja (svibanj 2015. – veljača 2016.).

Specifične onečišćujuće tvari	KRUSKAL-WALLIS TEST:	
	Postaje	Vrijeme uzorkovanja
OCP (µg/L)	$H_{6,28} = 1,36; p=0,97$	$H_{3,28} = 13,52; p=0,003$
Endosulfan (µg/L)	$H_{6,28} = 8,94; p=0,2$	$H_{3,28} = 0,19; p=0,98$
Ciklodienski pesticidi (µg/L)	$H_{6,28} = 2,19; p=0,9$	$H_{3,28} = 11,7; p=0,008$
Izodrin (µg/L)	$H_{6,28} = 6,11; p=0,4$	$H_{3,28} = 4,7; p=0,19$
Heptaklor (µg/L)	$H_{6,28} = 2,17; p=0,9$	$H_{3,28} = 18,2; p=0,0004$
Endrin (µg/L)	$H_{6,28} = 1,23; p=0,98$	$H_{3,28} = 19,96; p=0,0002$
Dieldrin (µg/L)	$H_{6,28} = 1,6; p=0,95$	$H_{3,28} = 19,22; p=0,0002$
Aldrin (µg/L)	$H_{6,28} = 1,07; p=0,98$	$H_{3,28} = 22,7; p=0,00001$
DDT i metaboliti (µg/L)	$H_{6,28} = 8,06; p=0,2$	$H_{3,28} = 10,99; p=0,01$
HCH zbroj (µg/L)	$H_{6,28} = 3,75; p=0,7$	$H_{3,28} = 14,89; p=0,002$
Lindan (µg/L)	$H_{6,28} = 5,5; p=0,5$	$H_{3,28} = 14,85; p=0,002$
HCH-d (µg/L)	$H_{6,28} = 6,0; p=0,42$	$H_{3,28} = 7,55; p=0,06$
HCH-b (µg/L)	$H_{6,28} = 3,6; p=0,7$	$H_{3,28} = 15,4; p=0,002$
HCH-a (µg/L)	$H_{6,28} = 1,56; p=0,95$	$H_{3,28} = 14,3; p=0,003$
HCB (µg/L)	$H_{6,28} = 0,00; p=1$	$H_{3,28} = 0,00; p=1$
AOX (µg/L)	$H_{6,28} = 4,32; p=0,63$	$H_{3,28} = 9,6; p=0,02$

Kruskal Wallis ANOVA pokazala je da između postaja u svim parametrima specifičnih onečišćujućih tvari ne postoji statistički značajna razlika (tablica 5).

3.4. Lemna test

3.4.1. Prirast broja biljaka

Srednji prirast broja biljaka (frondova) vodene leće (*L. minor*) uzgajane tijekom 7 dana u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica iz svibnja 2015. godine bio je najveći u uzorcima

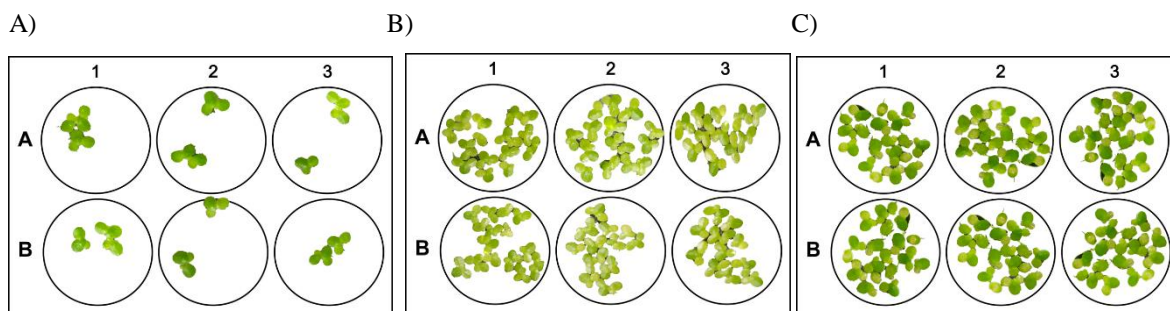
vode s postaje S7 ($0,25 \pm 0,08 \text{ dan}^{-1}$), dok je najmanji srednji prirast bio u uzorcima vode s postaja S4 i S5 ($0,22 \pm 0,05 \text{ dan}^{-1}$).

Najveći srednji prirast broja biljaka *L. minor* u uzorcima vode iz rujna 2015. godine bio je s postaje S3 ($0,34 \pm 0,03 \text{ dan}^{-1}$), a najmanji s postaja S1 ($0,21 \pm 0,06 \text{ dan}^{-1}$) i S2 ($0,21 \pm 0,05 \text{ dan}^{-1}$). Prirast broja biljaka *L. minor* 1. dana i 7. dana u uzorcima vode uzetim sa postaje S3 (veljača 2016.) i u mediju po Steinberg-u vidljiv je na slici 23 (A-C).

Tablica 6. Srednji prirast broja biljaka (dan^{-1}) vodene leće (*L. minor*) \pm SD uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica s postaja S1 – S7 iz svibnja, rujna i studenog 2015. te veljače 2016. godine.

Postaje	Srednji prirast broja biljaka (dan^{-1}) <i>L. minor</i> \pm standardna devijacija			
	Svibanj 2015.	Rujan 2015.	Studenj 2015.	Veljača 2016.
S1	$0,24 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,07$
S2	$0,24 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,08$
S3	$0,23 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,07$
S4	$0,22 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,09$
S5	$0,22 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,09$
S6	$0,24 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,07$
S7	$0,25 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,06$

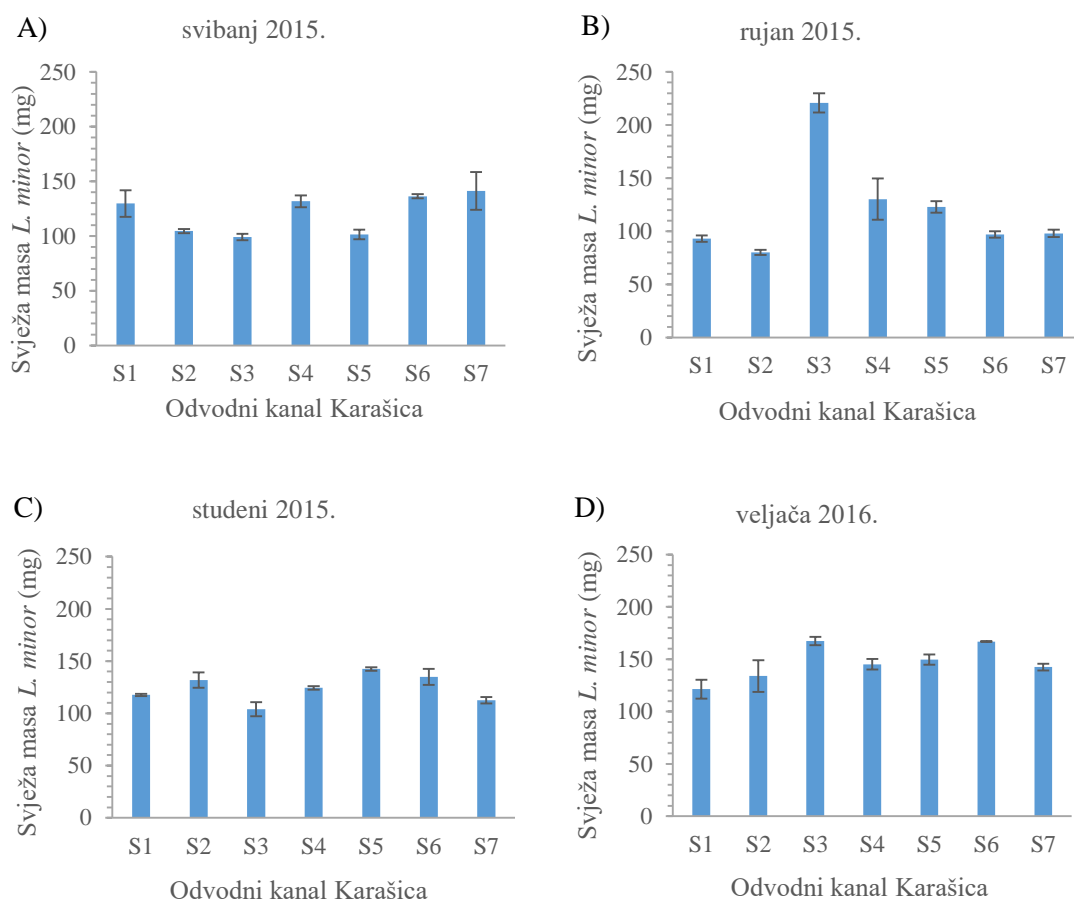
U uzorcima vode iz studenog 2015. godine najveći srednji prirast *L. minor* bio je s postaje S3 ($0,28 \pm 0,07 \text{ dan}^{-1}$), a najmanji s postaja S1 ($0,24 \pm 0,07 \text{ dan}^{-1}$) i S2 ($0,24 \pm 0,08 \text{ dan}^{-1}$). Najveći srednji prirast broja biljaka *L. minor* u uzorcima vode iz veljače 2016. godine bio je s postaje S4 i S5 ($0,29 \pm 0,09 \text{ dan}^{-1}$), a najmanji s postaje S3 ($0,21 \pm 0,07 \text{ dan}^{-1}$).



Slika 23. Prirast broja biljaka *L. minor* 1. dana (A) i 7. dana (B) u uzorcima vode uzetim sa postaje S3 (veljača 2016.) i u mediju po Steinberg-u (C).

3.4.2. Svježa masa biljaka

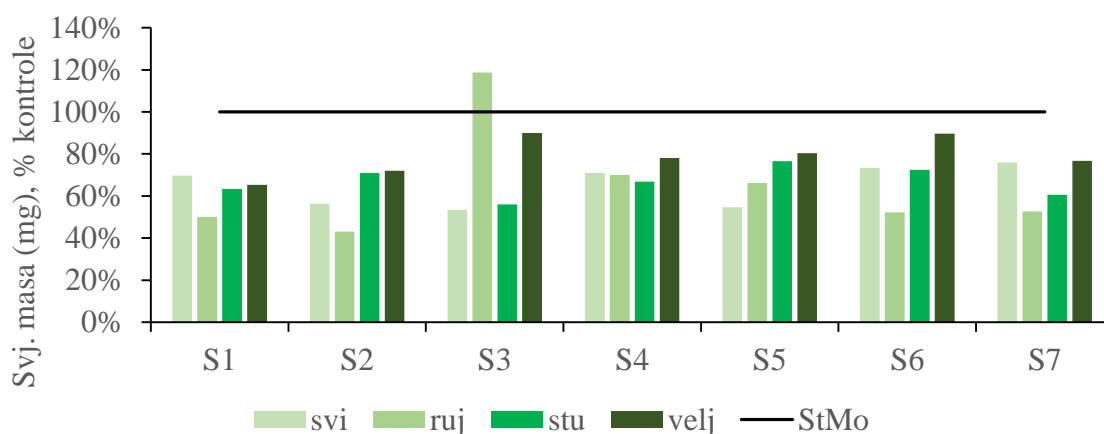
Najveća srednja vrijednost svježe mase biljaka vodene leće nakon 7 dana rasta u uzorcima vode s istraživanih postaja bila je u uzorcima s postaje S3 (220, 86 mg), a najmanja (80,16 mg) s postaje S2 iz rujna 2015. godine (slika 24).



Slika 24. Srednja vrijednost i standardna devijacija svježe mase vrste *L. minor* (mg) po postojama u mjesecu svibnju (A), rujnu (B), studenom (C) 2015. godine te veljači 2016. godine (D).

Također, u rujnu su uočene najveće promjene srednjih vrijednosti svježe mase između postaja, dok su najmanje promjene vrijednosti bile u studenom 2015. godine (slika 24). Svježa masa biljaka *L. minor* bila je u značajnoj pozitivnoj korelaciji s koncentracijom hranjivih tvari koja je izmjerena u uzorcima vode iz Odvodnog kanala Karašica (S1-S7) u kojima je *L. minor* uzgajana. Pozitivna korelacija utvrđena je između svježe mase biljaka i $\text{NH}_4\text{-N}$ ($r = 0,433$; $p = 0,02$), $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ ($r = 0,404$; $p = 0,033$), uk. Kjeldahl-N ($r = 0,492$; $p = 0,008$), ukupnog N ($r = 0,388$; $p = 0,041$), o-fosfata ($r = 0,403$; $p = 0,033$), sulfata ($r = 0,519$; $p = 0,005$) i kalcija ($r = 0,494$; $p = 0,008$).

Svježa masa biljaka u odnosu na kontrolu bila je najmanja (43%) u biljkama uzgajanim u uzorcima vode s postaje S2 iz rujna 2015. godine, a najveća (119%) u odnosu na kontrolu u biljkama uzgajanim u uzorcima vode postaje S3 uzorkovane u rujnu 2015. godine (slika 25). Najveća srednja vrijednost svih mjeseci svježe mase u odnosu na kontrolu iznosila je 79,51% na postaji S3, a najmanja (60,57%) na postaji S2, a zatim na postaji S1 (62,09%), slika 25.



Slika 25. Svježa masa (FW, mg) izražena kao postotak u odnosu na kontrolu (100%) u biljkama vodene leće uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica prikazan po postajama i mjesecima uzorkovanja.

Tablica 7. Srednja vrijednost \pm standardna devijacija svježe mase biljaka *L. minor* (FW, mg) i rezultati Tukey testa (ANOVA: $F_{7,65}=7,4$, $p=0,000$). Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike ($p<0,05$).

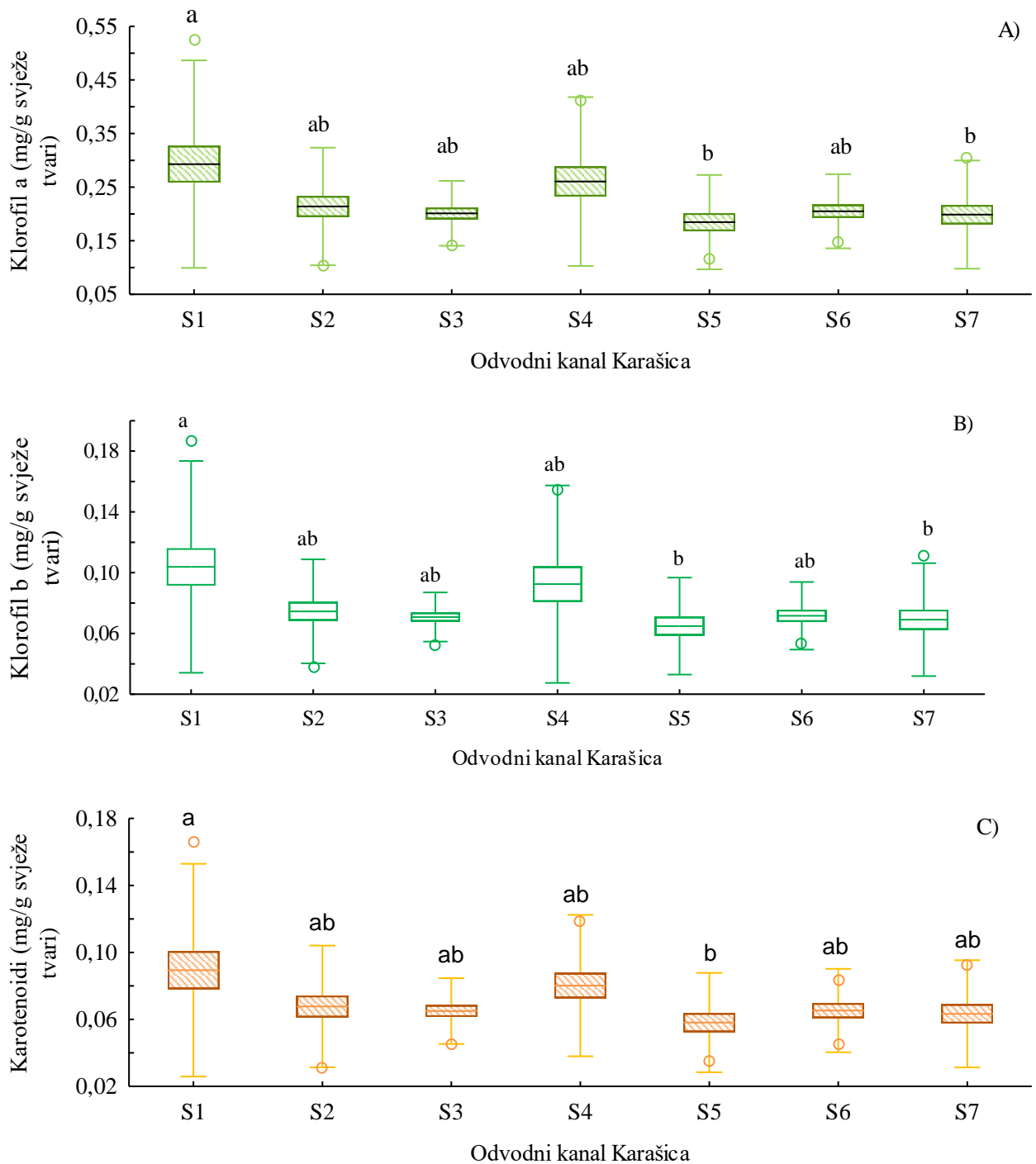
Postaje Odvodnog kanala Karašica							Kontrola
S1	S2	S7	S4	S5	S6	S3	StMo
118,2 \pm 33,3	119,9 \pm 39,3	160,6 \pm 48,5	136,0 \pm 27,4	139,3 \pm 42,2	146,4 \pm 43,8	130,9 \pm 35,8	186,0 \pm 5,1
a	a	ab	ab	ab	abc	bc	c

3.4.3. Koncentracija klorofila *a* (Chla), klorofila *b* (Chlb) i karotenoida (Car)

U veljači 2016. godine izmjerene su maksimalne vrijednosti Chla (0,3798 mg/g sv. tv.) i Chlb (0,1424 mg/g sv. tv.) vrste *L. minor* u uzorcima vode s postaje S4, dok su najmanje vrijednosti izmjerene s postaje S5, također u veljači 2016. godine. Maksimalne vrijednosti Chla i Chlb Odvodnog kanala Karašica tijekom 2015. godine bile su tijekom svibnja, rujna i studenog u uzorcima vode s postaje S1, slika 25.

Vodena leća koja je rasla u uzorcima vode s postaje S1 iz svibnja 2015. godine imala je maksimalnu vrijednost karotenoida, Car (0,1189 mg/g svj.tv.), a slična vrijednost (0,1101 mg/g svj.tv.) bila je i na postaji S4 u veljači 2016. godine. Sadržaj Car bio je najmanji (0,0379 mg/g svj.tv.) u vodenoj leći na postaji S5 također u veljači 2016. godine.

Prema koncentraciji Chla utvrđena je statistički značajna razlika između postaja S1 i S5 te S1 i S7. Postaja S1 izdvajala se po najvećoj vrijednosti Chla (0,378 mg/g svj.tv.) u vodenoj leći (*L. minor*) uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica iz svibnja 2015. godine, dok je srednja vrijednost Chla u svibnju, rujnu i studenom 2015. te veljači 2016. godine iznosila $0.293 \pm 0,058$ mg/g svj.tv. Postaje S5 i S7 izdvajale su se po najmanjim vrijednostima Chla koje su, kao i srednje vrijednosti Chla svih istraživanih mjeseci na tim postajama, bile slične. Tako je srednja vrijednost Chla svih mjeseci na postaji S5 iznosila $0,189 \pm 0,029$ mg/g svj.tv., dok je na postaji S7 bila $0,198 \pm 0,026$ mg/g svj.tv. Najmanja vrijednost Chla (0,125 mg/g svj.tv.) na postaji S5 bila je vodenoj leći (*L. minor*) uzgajana u uzorcima vode iz veljače 2016. godine, a na postaji S7 iz rujna 2015. godine (0,163 mg/g svj.tv.), slika 26 A.



Slika 26. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost Chla (a), Chlb (b) i karotenoida (c) (mg/g svj.tv.) vodene leće (*L. minor*) uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica (S1-S7) iz svibnja, rujna i studenog 2015. te veljače 2016. godine.

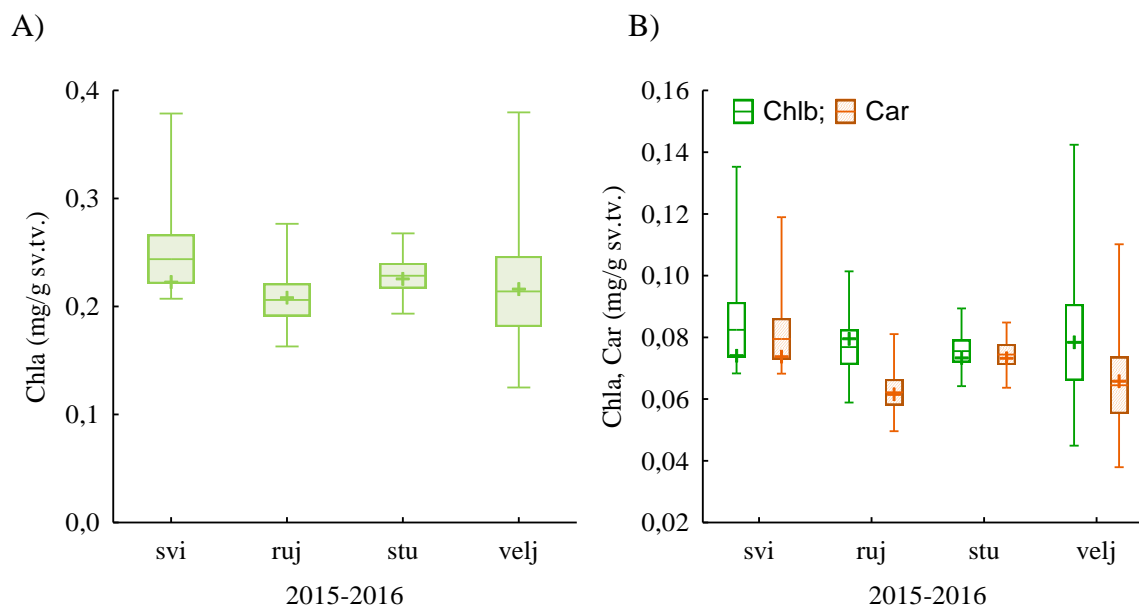
Utvrđena je pozitivna korelacija omjera Chla/Chlb *L. minor* s mikrobiološkim pokazateljima, nitratima i pesticidima te negativna korelacija omjera Chl(a+b)/Car i herbicida te sulfata, kalija i kalcija u vodi Odvodnog kanala Karašica (tablica 8).

Tablica 8. Koeficijent korelacije (Spearman rank) između parametara izmjerenih u vodi Odvodnog kanala Karašica i Chla/Chlb te Chla+b/Car izmjerenih u *L. minor* uzgajanoj u toj vodi.

Varijabla	Chla+b mg/g svježe tvari	Chla+b/Car mg/g svježe tvari
Alkalitet (ml 0,1 N HCl/100 ml)	r = - 0,5413; p = 0,003	r = 0,5575; p = 0,002
EC (mS/cm)	r = - 0,4285; p = 0,023	r = 0,2216; p = 0,257
FC (cfu/100 ml)	r = 0,3952; p = 0,037	r = - 0,4654; p = 0,013
<i>E. coli</i> (cfu/100 ml)	r = 0,4139; p = 0,029	r = - 0,4814; p = 0,009
EN (cfu/100 ml)	r = 0,3899; p = 0,040	r = - 0,3730; p = 0,051
CFU (22°C/ml)	r = 0,5505; p = 0,002	r = - 0,4149; p = 0,028
CFU (37°C/ml)	r = 0,4744; p = 0,011	r = - 0,4550; p = 0,015
Fe (mg/L)	r = -0,2598; p = 0,182	r = 0,4805; p = 0,010
Cu (µg/L)	r = - 0,5903; p = 0,001	r = 0,6052; p = 0,001
Zn (µg/L)	r = - 0,4096; p = 0,030	r = - 0,0251; p = 0,899
HCH-a (µg/L)	r = 0,5298; p = 0,004	r = - 0,2938; p = 0,129
HCH-b (µg/L)	r = 0,4333; p = 0,021	r = - 0,2713; p = 0,163
HCH-d (µg/L)	r = 0,6160; p = 0,000	r = - 0,4708; p = 0,011
Lindan (µg/L)	r = 0,5291; p = 0,004	r = - 0,4283; p = 0,023
HCH uk. (µg/L)	r = 0,7016; p = 0,000	r = - 0,5223; p = 0,004
DDT (µg/L)	r = 0,4072; p = 0,031	r = - 0,2541; p = 0,192
Aldrin (µg/L)	r = 0,4336; p = 0,021	r = - 0,4857; p = 0,009
Heptaklor (µg/L)	r = 0,4861; p = 0,009	r = - 0,3582; p = 0,061
Endrin (µg/L)	r = 0,4627; p = 0,013	r = - 0,4771; p = 0,010
Ciklodienski pesticidi (µg/L)	r = 0,4597; p = 0,014	r = - 0,3336; p = 0,083
OCP (µg/L)	r = 0,6627; p = 0,000	r = - 0,4631; p = 0,013
NO ₃ -N (mg/L)	r = - 0,4824; p = 0,009	r = 0,2410; p = 0,217
NO ₂ -N (mg/L)	r = 0,3281; p = 0,088	r = - 0,5622; p = 0,002
NO ₃ +NO ₂ (mg/L)	r = - 0,4426; p = 0,018	r = 0,1827; p = 0,352
PO ₄ (mg/L)	r = - 0,3757; p = 0,049	r = 0,2586; p = 0,184
Cl (mg/L)	r = - 0,2998; p = 0,121	r = 0,0893; p = 0,652
SO ₄ (mg/L)	r = 0,5042; p = 0,006	r = - 0,5095; p = 0,006
Na (mg/L)	r = - 0,3476; p = 0,070	r = 0,2060; p = 0,293
K (mg/L)	r = 0,8419; p = 0,000	r = - 0,8446; p = 0,000
Ca (mg/L)	r = 0,6233; p = 0,000	r = - 0,5492; p = 0,002

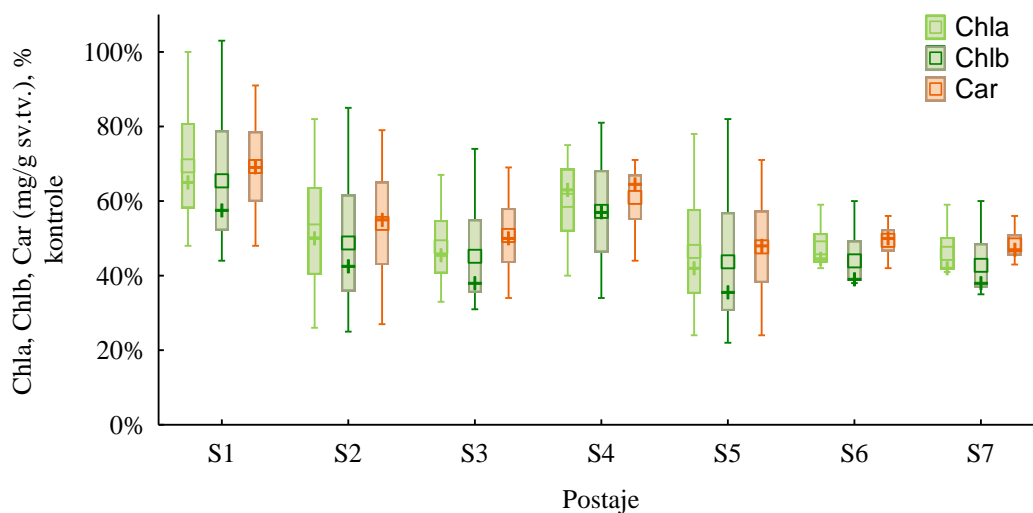
Nadalje, prema koncentraciji klorofila b (Chlb) utvrđena je statistički značajna razlika između postaja S1 i S5 te postaja S1 i S7. Postaja S1 izdvajala se po najvećoj vrijednosti Chlb (0,135 mg/g svj.tv.) u vodenoj leći (*L. minor*) uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica iz svibnja 2015. godine, dok je srednja vrijednost Chlb iz svibnja, rujna i studenog 2015. te veljače 2016. godine iznosila $0,104 \pm 0,022$ mg/g svj.tv. Postaja S5 izdvajala se po najmanjim vrijednostima Chlb (0,045 mg/g svj.tv.) vodene leće uzgajane u uzorcima vode iz veljače 2016. godine, a slična najmanja vrijednost Chlb utvrđena je u vodenoj leći (*L. minor*) s postaje S7 (0,059 mg/g svj.tv.) u uzorcima vode iz rujna 2015. godine. Srednja vrijednost Chlb svih mjeseci na postaji S5 iznosila je $0,066 \pm 0,009$ mg/g svj.tv., a vrlo sličnu srednju vrijednost svih mjeseci Chlb imala je i postaja S7 te je iznosila $0,069 \pm 0,009$ mg/g svj.tv. (slika 26 B).

S obzirom na koncentraciju Car utvrđena je statistički značajna razlika između postaje S1, koja se izdvajala po najvećem sadržaju Car (0,119 mg/g svj.tv.) u vodenoj leći (*L. minor*) uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica iz svibnja 2015. godine, te postaje S5 izdvajane po najmanjem sadržaju Car (0,038 mg/g svj.tv.) u vodenoj leći (*L. minor*) uzgajane u uzorcima vode iz veljače 2016. godine. Srednja vrijednost Car svih mjeseci (svibanj, rujna i studeni 2015. te veljača 2016. godine) na postaji S5 iznosila je $0,060 \pm 0,012$ mg/g svj.tv., dok je na postaji S7 bila nešto veća ($0,089 \pm 0,019$ mg/g svj.tv.), slika 26 C.



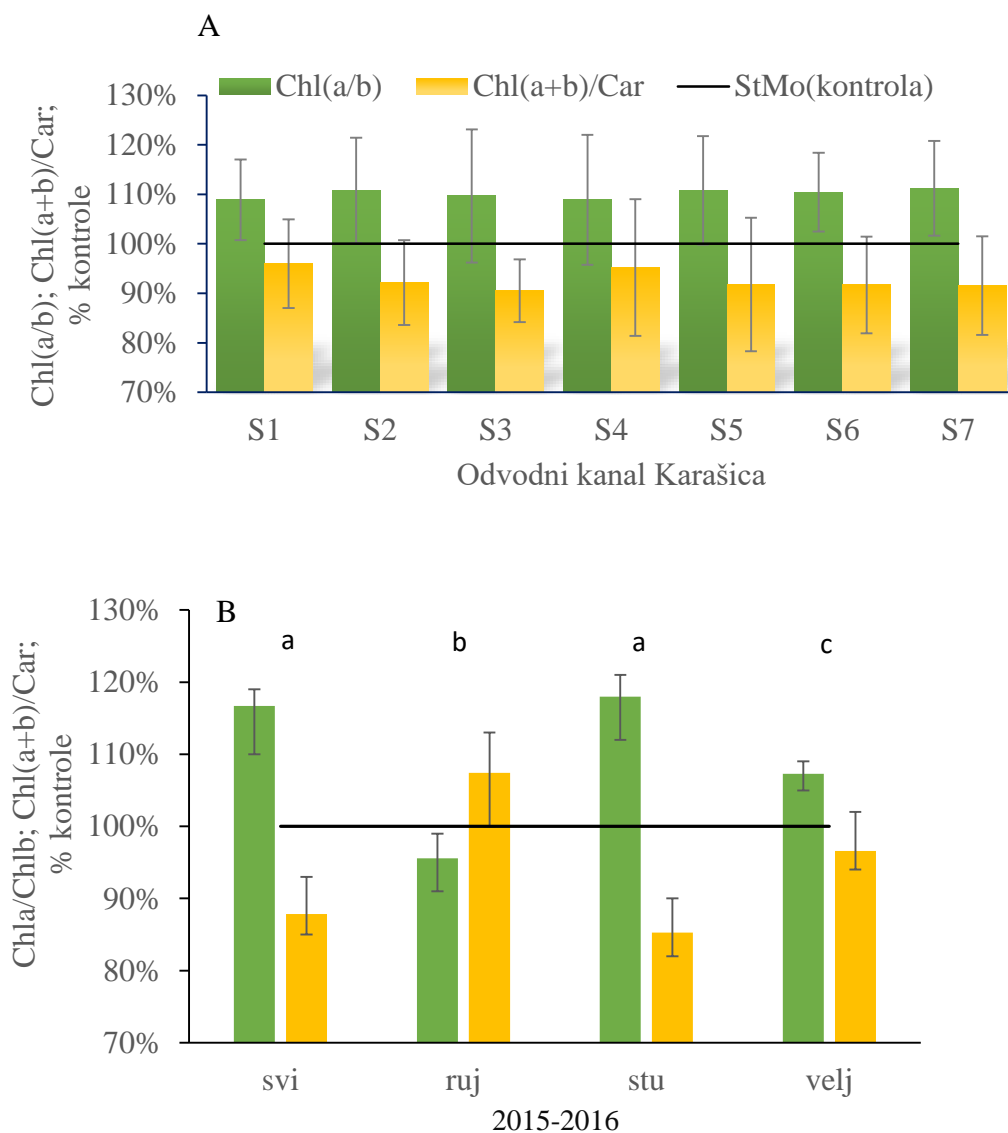
Slika 27. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost Chla(A), Chlb i Car (B) (mg/g svj.tv.) vodene leće (*L. minor*) uzgajane u uzorcima vode svih postaja (S1-S7) Odvodnog kanala Karašica po mjesecima.

Uspoređujući istraživane mjesece nije utvrđena statistički značajna razlika između koncentracija klorofila a ($F_{3,24} = 0,5712$; $p = 0,6394$), klorofila b ($F_{3,24} = 0,1299$; $p = 0,9414$) i karotenoida ($F_{3,24} = 1,6993$; $p = 0,1938$).



Slika 28. Sadržaj fotosintetskih pigmenata (srednja vrijednost i standardna devijacija Chla, Chlb i Car) u vodenoj leći uzgajanoj u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica izražena kao % u odnosu na sadržaj istih pigmenata vodene leće u kontrolnom uzorku vode (StMo).

Koncentracije pigmenata Chla ($F_{7,62} = 14,30$, $p < 0,001$), Chlb ($F_{7,62} = 15,81$, $p < 0,001$) i Car ($F_{7,62} = 13,10$, $p < 0,001$) izmjerene u biljkama uzgajanim u istraživanim uzorcima vode značajno su manje u odnosu na koncentracije fotosintetskih pigmenata vodene leće koje su rasle u kontroli (Steinberg medij - StMo), slika 27. Sadržaj pigmenata Chla, Chlb i Car iznosio je najmanje (24%, 22% i 24%) u odnosu na kontrolu u biljkama uzgajanim u uzorcima vode s postaje S5 iz veljače 2016. godine, a najviše (100%, 103% i 91%) u odnosu na kontrolu u biljkama uzgajanim u uzorcima vode postaje S1 uzorkovane u rujnu 2015. godine, slika 28.



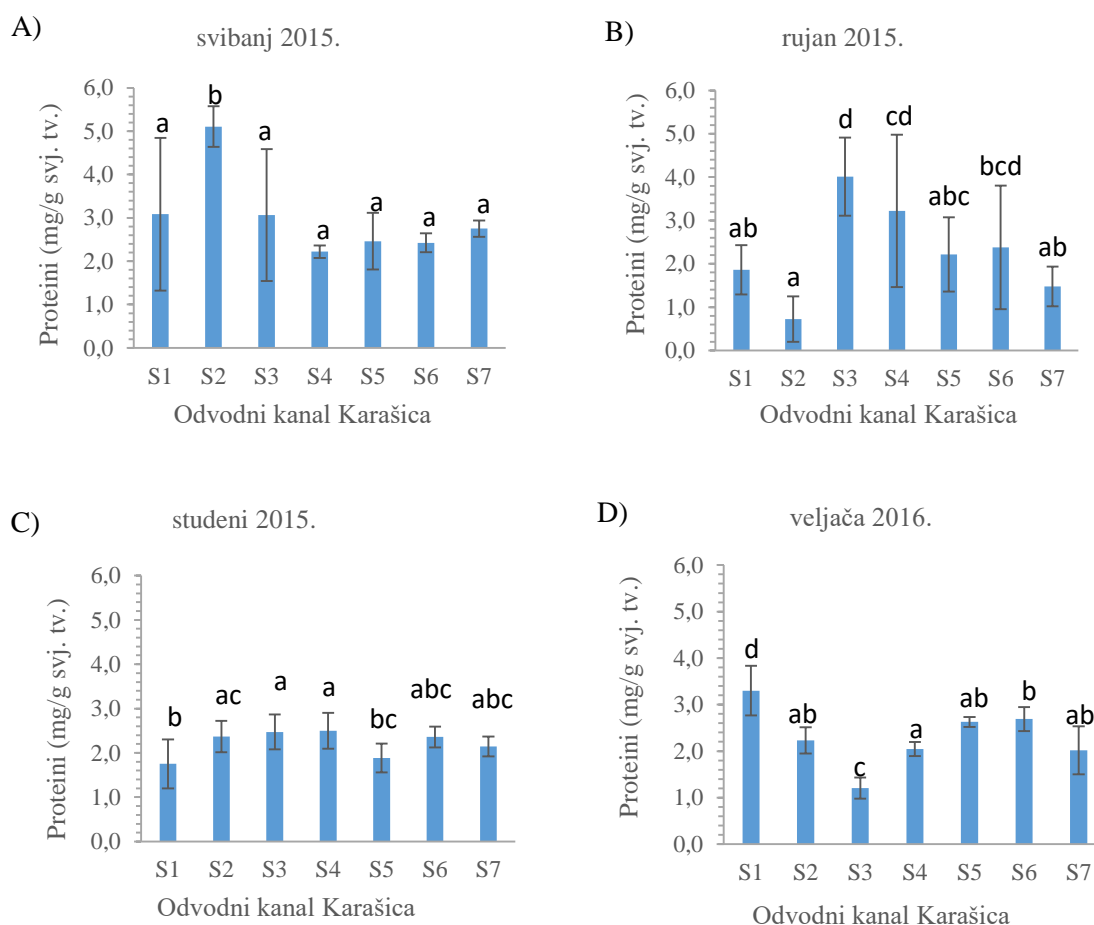
Slika 29. Omjer fotosintetskih pigmenata $Chl(a)/Chl(b)$ i $Chl(a+b)/Car$ (srednja, minimalna i maksimalna vrijednost) izražen kao postotak u odnosu na kontrolu (100%) u biljkama vodene leće uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica prikazan po postajama (A) i mjesecima uzorkovanja (B).

Utvrđen je značajan porast omjera $Chl(a)/Chl(b)$ za više od 20% u odnosu na kontrolu u biljkama uzgajanim u uzorcima vode postaja S3 i S4 uzorkovanim u studenom 2015. godine i smanjenje omjera $Chl(a+b)/Car$ za 17%, odnosno 18% u istim tim uzorcima. Slično je utvrđeno i u uzorcima mjeseca svibnja 2015. godine. Razlika između uzoraka po mjesecima utvrđena je i za omjer $Chl(a/b)$ ($F_{3,24} = 101,34$; $p = 0.0000$) i $Chl(a+b)/Car$ ($F_{3,24} = 67,34$; $p = 0.0000$), slika 29 A i B.

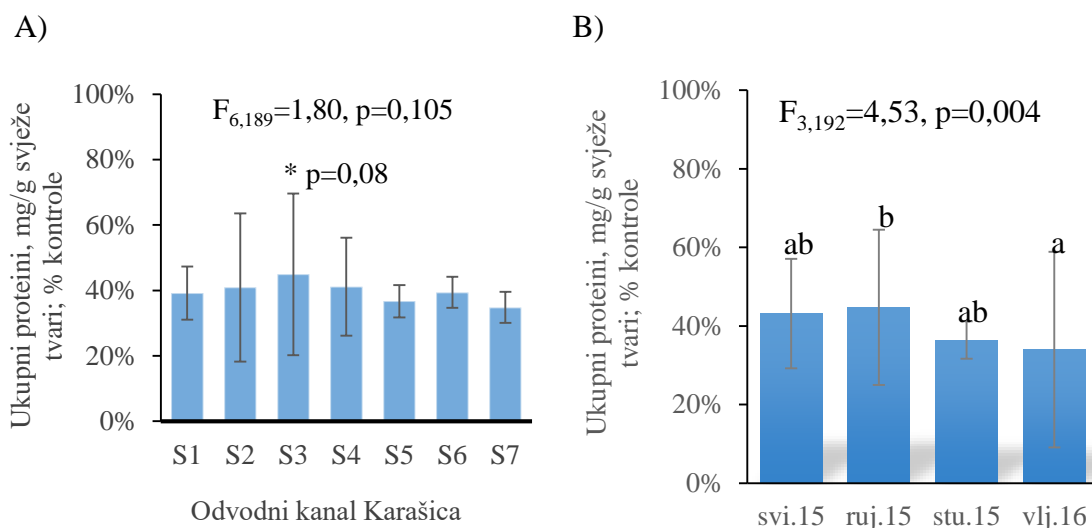
3.4.4. Koncentracija proteina

Najveća koncentracija proteina (5,105 mg/g svj. tv.) izmjerena je u vrsti *L. minor* u uzorcima vode iz svibnja 2015. godine na postaji S2, a najmanja (0,723 mg/g svj. tv.) na istoj postaji u rujnu 2015. godine.

U studenom 2015. godine uočene su najmanje razlike u koncentraciji proteina između postaja. U veljači 2016. godine vidljivo je smanjenje koncentracije proteina od postaje S1 prema postaji S3, a zatim porast od postaje S3 prema kraju kanala (slika 23 D). Koncentracija proteina u *L. minor* bila je u pozitivnoj korelaciji s $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ ($r = 0,432$; $p = 0,022$) izmjerenim u istraživanim uzorcima vode iz Odvodnog kanala Karašica.



Slika 30. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost proteina (mg/g svj.tv.) Odvodnog kanala Karašica po postajama (A, B, C, D) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).



Slika 31. Ukupni proteini (srednja, minimalna i maksimalna vrijednost) izraženi kao postotak u odnosu na kontrolu (100%) u biljkama vodene leće uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica prikazani po postajama (B) i mjesecima uzorkovanja (A). Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

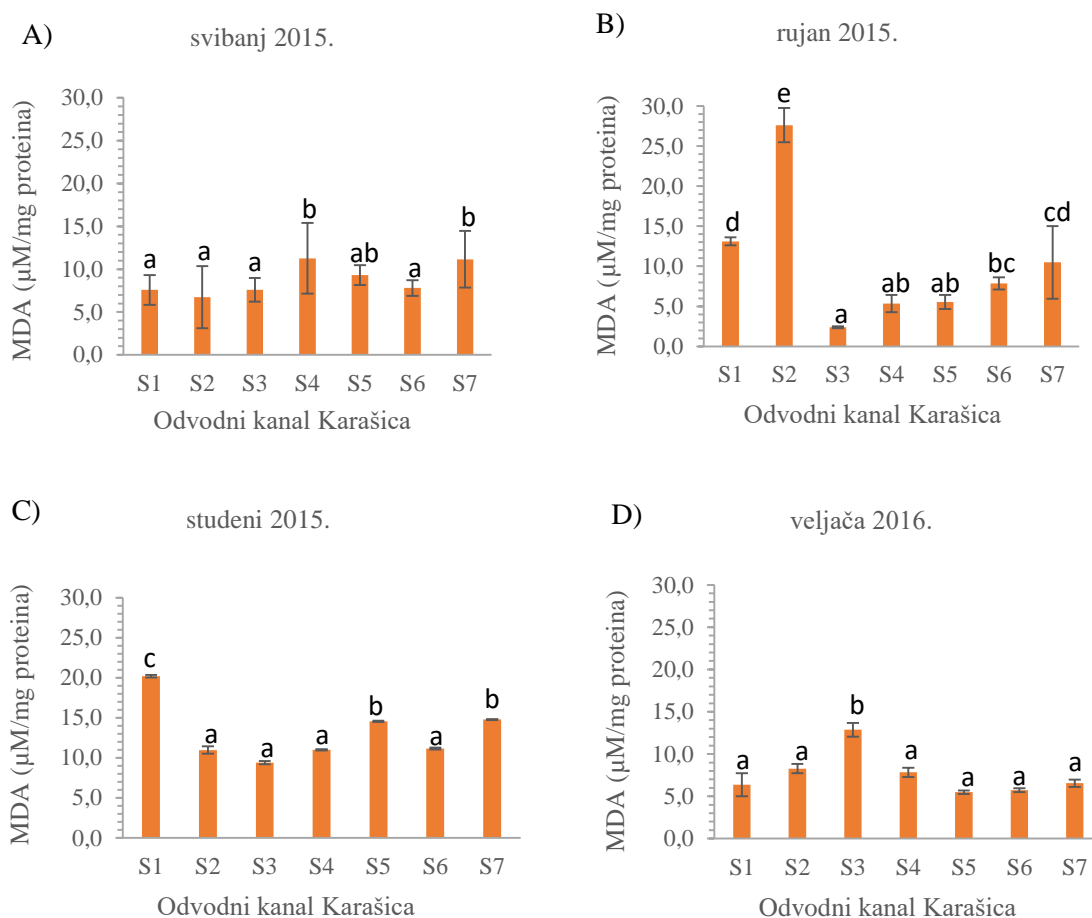
Prema dobivenim rezultatima koncentracije proteina u odnosu na kontrolu vidljivo je da između postaja nema razlike, ali se izdvaja postaja S3 po najvećoj koncentraciji proteina u odnosu na kontrolu, koja nije statistički značajna (slika 31 A).

3.4.5. Koncentracija malondialdehida (MDA)

Nakon 7 dana rasta vodene leće (*L. minor*) u testiranim uzorcima iz kanala Karašica, izmjerena je količina MDA, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, što je prikazano na slikama 32 (A, B, C, D) i 33 A), B). Tijekom cijelog istraživnog razdoblja izdvajala se postaje S2 s najvećom (13,148 μmol MDA/mg proteina) vrijednosti, zatim su slijedi postaja S1 (11.813 μmol MDA/mg proteina) i S7 (10,741 μmol MDA/mg proteina), dok je količina MDA izmjerena u vrsti *Lemna minor* u vodi s postaja S3 do S6 bila slična (slika 32).

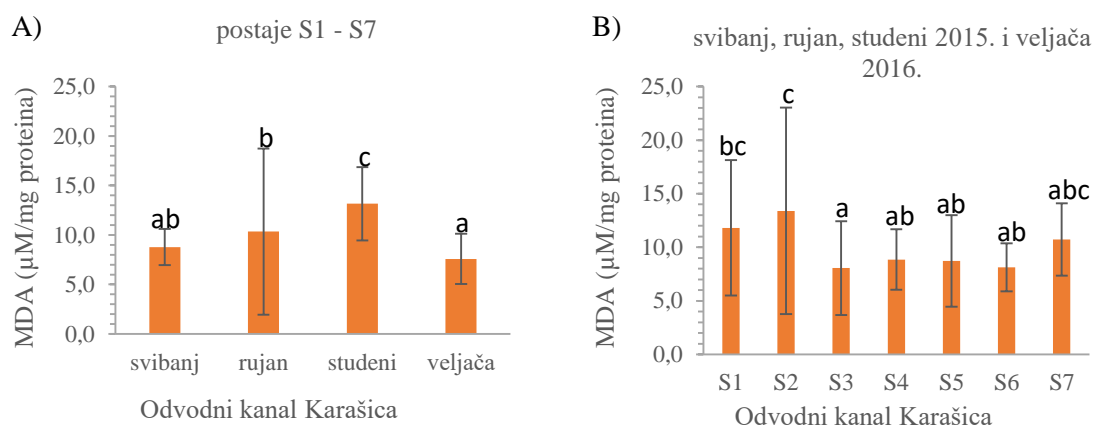
Količina MDA bila je u značajnoj negativnoj korelaciji s $\text{NO}_3\text{-N}$ ($r = -0,584$; $p = 0,001$), $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ ($r = -0,609$; $p = 0,001$), Zn ($r = -0,416$; $p = 0,028$) i Cl ($r = -0,603$; $p = 0,01$) izmjerenim u uzorcima vode Odvodnog kanal Karašica (S1-S7). S druge strane, količina

MDA bila je u pozitivnoj korelaciji s ukupnim heksaklorcikloheksanom, HCH ($r = 0,384$; $p = 0,04$) i organoklorovim pesticidima, OCP ($r = 0,368$; $p = 0,049$).

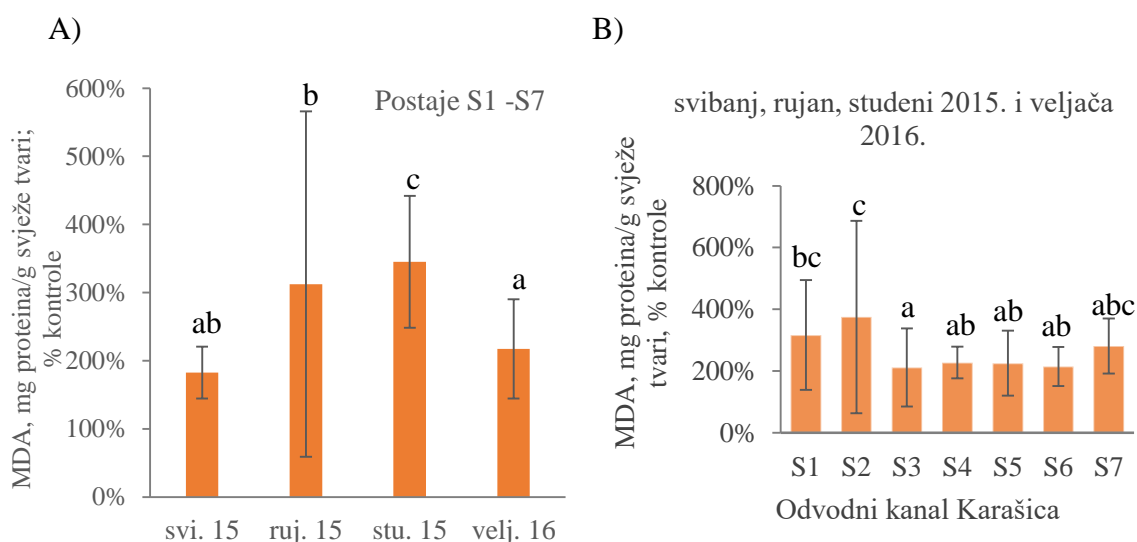


Slika 32. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost MDA (μmol) / mg proteina Odvodnog kanala Karašica po postajama (a, b, c d) u razdoblju od svibnja do studenog 2015. te veljače 2016. godine. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

Na postaji S2 najveća vrijednost MDA ($26,607 \mu\text{mol MDA/mg proteina}$) bila je u rujnu, a na postaji S1 ($10,971 \mu\text{mol MDA/mg proteina}$) u studenom 2015. godine. Sveukupno, najveće vrijednosti MDA izmjerene su u vodi Odvodnog kanala Karašica u studenom 2015. godine, a najmanje u uzorcima vode iz veljače 2016. godine (slika 32).



Slika 33. Minimalna, maksimalna i srednja vrijednost MDA (μmol)/mg proteina Odvodnog kanala Karašica po mjesecima (a) koji uključuju sve postaje te po postajama (b) koje se odnose na sve mjesece. Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).



Slika 34. Koncentracija malondialdehida (srednja, minimalna i maksimalna vrijednost) izražena kao postotak u odnosu na kontrolu (100%) u biljkama vodene leće uzgajane u uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica prikazan po mjesecima uzorkovanja (A) i postajama (B). Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike između postaja prema Tukey HSD testu ($p < 0,05$).

4. Rasprava

Praćenje kemijskih i fizikalno kemijskih svojstava (monitoring) površinskih voda značajan je čimbenik u kontroli kvalitete i upravljanju vodama. Kvaliteta površinskih voda pod utjecajem je prirodnih procesa (npr. biogeokemijski ciklusi), ispuštanja industrijskih i komunalnih otpadnih voda te otjecanja oborinskih voda s okolnog slivnog područja (antropogeni utjecaj). Stoga je ukupna kakvoća vode vrlo promjenjiva tijekom vremena, jer ovisi o nizu prirodnih i ljudskih aktivnosti. Područje Baranje nema prirodno razvijenu hidrografsku mrežu, već su brojni vodotoci i kanali umjetno formirani u cilju odvodnje suvišnih voda s poljoprivrednog zemljišta (Bognar, 1990). Slivnu površinu Odvodnog kanala Karašica u Baranji čine kultivirane parcele i nenavodnjavano obradivo zemljište te pretežno poljodjelska zemljišta (CORINE Land Cover Hrvatska, 2006), a gnojidba mineralnim i organskim gnojivima te primjena zaštitnih sredstava (pesticida) odražavaju se na kvalitetu vode kanala. Manji zagađivač voda ovog vodotoka je odvodni sustav Beli Manastir iz kojeg se komunalne otpadne vode nakon djelomičnog pročišćavanja ispuštaju u Odvodni kanal Karašica. Prema ocjeni lokalne komunalne organizacije, na spomenuti odvodni sustav su, osim kućanstava, priključeni i sljedeći zagađivači: „Mlin“, „Mesna industrija“, „Mljekara“, „Starco“ i „Remont“. Sva prikupljena otpadna voda u sustavu javne odvodnje odvodi se u nepročišćenom stanju na lokaciju Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda i nakon pročišćavanja na mehaničko-biološkom dijelu Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda ispušta u Odvodni kanal Karašica (Web 3).

Kvalitativne karakteristike vode, kao što su fizikalno kemijska svojstva vode te ekološko stanje ne ukazuju na prirodne, ili antropogenim utjecajima izazvane klimatske fluktuacije, već su njihova posljedica. Klimatske osobine istraživanog područja dio su klimatskih osobina šireg prostora Baranje, ali i područja Istočne Hrvatske, koje ima obilježja umjerene kontinentalne klime. Klimatska obilježja određena su relativno velikim godišnjim temperaturnim rasponima i rasporedom oborina. Broj padalinskih dana i pravilan raspored padalina tijekom godine važni su za rast biljnog pokrova, poljoprivrednu proizvodnju i hidrološke uvjete ovog područja. Ukupno je tijekom 2015. godine zabilježeno 132 dana s oborinama, što je nešto manje u odnosu na ostali dio kontinentalne Hrvatske. Prema Svjetskoj meteorološkoj organizaciji, 2015. godina ušla je u povijest zbog visokih temperatura, jakih toplinskih valova, iznimne oborine, razornih suša i neuobičajenih utjecaja tropskih ciklona. Na istraživanom je području proljeće bilo toplije od prosjeka, a oborinski je režim bio razmjerno rjeđi nego što je uobičajeno (relativna je razlika u odnosu na

prosječnu relativnu čestinu iz razdoblja 1971.-2000. veća od 25%). Međutim, prema klimatološkoj ocjeni, proljeće 2015. godine je u unutrašnjosti uglavnom bilo normalno kišovito (113% odstupanje). Razlog tome je što je u svega nekoliko kišnih dana, osobito u svibnju (Slike 6 i 8), pala vrlo velika količina oborina. Klimatološka analiza srednje sezonske temperature zraka (lipanj, srpanj, kolovoz) pokazala je kako je srednja temperatura zraka bila viša od srednjih vrijednosti za referentno razdoblje (2,7 °C), pa je ljeto 2015. godine bilo u kategoriji ekstremno toplo i uglavnom u kategorijama od normalno do vrlo sušno (70% odstupanje oborina) te je češći oborinski režim bio posljedica razmjerno kratkotrajnih intenzivnih oborina (slika 8). Klimatološka analiza jeseni pokazuje kako je istraživano područje bilo u kategoriji vrlo kišno (158% odstupanje), a takvoj je ocjeni sezone najviše doprinijela iznadprosječna količina oborine koja je zabilježena u listopadu 2015. godine (339% više od prosjeka, slika 8). Klimatološka analiza zimske sezone (prosinac 2015. te siječanj i veljača 2016.) pokazala je kako je istraživano područje bilo u kategoriji ekstremno toplo, a prema oborinama tijekom zime u kategoriji normalno (Web 4).

Najznačajniji klimatski čimbenici koji utječu na ekološko stanje Odvodnog kanala Karašica u Baranji bili su, dakle, temperatura zraka i oborine te ekstremne vrijednosti ovih parametara. Prema scenariju klimatskih promjena za Hrvatsku, promjene oborinskih prilika na području Hrvatske u bližoj budućnosti (do 2040.), u odnosu na sadašnju klimu, projicirane su za jesen kada se u većem dijelu Hrvatske može očekivati smanjenje oborine uglavnom između 2% i 8%. Međutim, na području Slavonije i Baranje količina oborina će se povećati između 2% i 12%, a na krajnjem istoku predviđeno povećanje iznosi i više od 12% i statistički je značajno. Osim toga jasan signal klimatskih promjena je i smanjenje ukupne količine oborina ljeti (Narodne novine, 2014). Dakle, kvaliteta voda Odvodnog kanala Karašica pod značajnim je utjecajem voda koje se nakon oborina slijevaju s oraničnih površina, ali i ispusta komunalnih otpadnih voda grada Belog Manastira u ljetnom razdoblju kada nema dodatnog razrijeđivanja vode.

In-situ mjerenja omogućuju brzu aproksimaciju fizikalno-kemijskih svojstava određenog vodnog tijela u vrijeme uzorkovanja. Otopljeni kisik jedan je od najčešće korištenih parametara za procjenu stanja vodenih ekosustava, a osim toga utječe i na topljivost potencijalno štetnih metala (Chapman, 1996). U ovom istraživanju koncentracija otopljenog kisika bila je obrnuto proporcionalna temperaturi vode Odvodnog kanala Karašica, što je sukladno Henryevom plinskom zakonu te potvrđuje činjenicu da su dobiveni podatci

adekvatni za procjenu stanja i potencijalne analize trenda. Osim toga, dobivena korelacija je u suglasnosti i s istraživanjima drugih autora (Villeneuve i sur., 2006; Chapra, 2008; Diamantini i sur., 2018). Što se tiče pH vrijednosti vode, ona nije varirala nizvodno od postaje S1 Odvodnog kanala Karašica te je uočen samo blagi porast, ali se zato razina specifične vodljivosti i alkaliteta vode povećala na postaji S3, nakon ispusta komunalnih otpadnih voda. Nakon ispusta nizvodno od postaje S3 dolazi do blagog opadanja specifične vodljivosti i alkaliteta. U nezagađenim se vodama pH uglavnom kontrolira ravnotežom između ugljikovog dioksida, karbonata i bikarbonatnih iona te drugih prirodnih spojeva, kao što su huminske kiseline (Iticescu i sur., 2014). Međutim, pH može ukazivati i na prisutnost otpadnih voda (Ramirez i sur., 2014), osobito ako se mjeri zajedno sa specifičnom vodljivosti. Naime, značajne promjene u specifičnoj vodljivosti prije i nakon ispusta pokazatelj su ulaska otpadnih voda (United States EPA, 2012; Ramirez i sur., 2014). Stoga se ovi parametri mogu upotrijebiti za određivanje opsega razrijeđenja otpadnih voda u prijemnim površinskim vodama.

Gotovo sve prirodne vode sadrže kloridne i sulfatne ione. Njihove koncentracije znatno variraju ovisno o geologiji područja. U malim količinama oni nisu značajni, dok u većim koncentracijama predstavljaju problem za kvalitetu vode. Uobičajeno su koncentracije klorida i sulfata površinskih kopnenih voda niske. Primjerice, visoke koncentracije klorida mogu negativno utjecati na vodene organizme (Nielsen i sur., 2003; Petruck i Stöffler, 2011). Izvori klorida u površinskim vodama su atmosfersko taloženje, trošenje sedimentnih stijena, kanalizacija i industrijske otpadne vode te otjecanje oborinskih voda s poljoprivrednih površina i cesta tijekom zime (Diamantini i sur., 2018). Također, za kloride se smatra da su u korelaciji s ljudskim aktivnostima, pogotovo u urbaniziranom području, dok na sadržaj sulfata više utječe geologija slivnog područja (Price i sur. 2018). Kloridi u vodi Odvodnog kanala Karašica u negativnoj su korelaciji s vodostajem, ali ne i padalinama na istraživanom području. Stoga se kloride prema rezultatima istraživanja može povezati s komunalnim otpadnim vodama, dok su sulfati vjerojatnije povezani sa sastavom tla slivnog područja Odvodnog kanala Karašica. Količina hranjivih tvari u vodotocima može varirati tijekom vremena i često je pod različitim utjecajima, bilo autohtonog ili alohtonog podrijetla (Ahearn i sur., 2005). Antropogeni utjecaj i način korištenja zemljišta najvjerojatnije su odgovorni za promjene u kvaliteti vode Odvodnog kanala Karašica. Naime, u mnogim je slivovima glavni izvor onečišćenja dušikom ispiranje s poljoprivrednog zemljišta, iako i komunalne otpadne vode mogu također biti značajan izvor. Što se tiče fosfora, najznačajniji izvor su industrija i

kućanstva. Prema izvješću Europske komisije o stanju okoliša ispiranje s poljoprivrednih površina odgovorno je za 50 do 70% onečišćenja dušikom, fosforom i sumporom, što uvelike narušava kvalitetu vode, a urbano otjecanje (komunalne otpadne vode) doprinosi s 5 do 15% ukupnom onečišćenju hranjivim tvarima (Web 1). Prema dobivenim rezultatima u odnosu na prisutne hranjive tvari, samo na postajama prije ispusta komunalnih otpadnih voda, može se reći da je postignuto dobro stanje vode, dok su na postajama nakon ispuštanja otpadnih voda koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$, organskog N, $\text{NO}_3\text{+NO}_2\text{-N}$ i ukupni N bile višestruko povećane (slike 13 i 14). Nizvodno prema ušću Odvodnog kanala dolazi do smanjenja koncentracija hranjivih tvari pa tako i $\text{NH}_4\text{-N}$, najvjerojatnije procesom nitrifikacije (Yu i sur., 2011). Količine ukupnog kao i organskog dušika bile su najveće u toplijem razdoblju godine, čime se potvrđuje prisutnost velikih količina organske tvari, primarno alohtonog porijekla, koja podliježe procesima razgradnje (Diamantini i sur., 2018). Osim toga, pozitivna korelacija između $\text{NH}_4\text{-N}$ i režima kisika (BPK5, BPK5/KPK) također ukazuje na pojačanu razgradnju prisutne organske tvari. Odnos između režima kisika, ukupnog fosfora i ortofosfata ukazuje da je u biološki razgradivoj organskoj tvari bio značajan udio fosfora. Osim toga, sugerira i mogućí doprinos fosfora u degradaciji kvalitete vode kroz eutrofikaciju nakon čega slijedi značajno smanjenje koncentracije otopljenog kisika. Izmjerene koncentracije ortofosfata i nitrata iznad su onoga što se smatra pozadinskom ili prirodnom razinom, odnosno pokazuju da je onečišćenje i dalje veliko. Također, visoke koncentracije N i P (slike 13-15) u vodi ukazuju na veliki potencijal daljnje eutrofikacije Odvodnog kanala Karašica nizvodno od ispusta, prvenstveno zbog pritjecanja otpadnih voda, a tek onda zbog voda koje se slijevaju s okolnog poljoprivrednog zemljišta, ali i sezonskih promjena u klimatskim parametrima.

Na biološku aktivnost, odnosno razgradnju organske tvari, ukazuje obrnuto proporcionalan odnos $\text{NO}_3\text{-N}$ i BPK_5 te $\text{NO}_3\text{-N}$ i TOC, što upućuje na sposobnost samopročišćavanja voda Odvodnog kanala Karašica. Omjer BPK_5/KPK pokazatelj je biološkog kapaciteta samopročišćavanja, odnosno udjela biološki razgradive organske tvari u ukupnoj organskoj tvari te može poprimiti vrijednosti od 0 do 1, pri čemu lako razgradljive organske tvari imaju omjer bliže 1, a teže razgradljive organske tvari bliže 0 (Kumar i sur., 2010). Ako je omjer $\text{BPK}_5/\text{KPK} > 0,6$ voda ima dobar kapacitet samo-pročišćavanja, 0,2-0,4 samo-pročišćavanje se odvija uz povoljne toplinske uvjete, a ako je $< 0,2$ nema biološkog samo-pročišćavanja (Yustiani i Komariah, 2017). U samo 5% uzoraka vode Odvodnog kanala Karašica utvrđen je dobar kapacitet samopročišćavanja (S6, u kolovozu i rujnu, te S4 i S5 u rujnu 2015. godine). U 50% uzoraka vode Odvodnog kanala Karašica utvrđeno je da se

samopročišćavanje vode može odvijati uz povoljne toplinske uvjete, a u 45% uzoraka utvrđeno je da nema biološkog samopročišćavanja ukazujući na moguće veće količine organske biološki nerazgradive tvari koje inhibiraju metaboličku aktivnost bakterija. Osim toga, značajna korelacija između ukupnog organskog ugljika i režima kisika ukazuje na veliku potrošnju kisika za razgradnju organske tvari. Visoki organski sadržaj u vodi dovodi do povećanja rasta mikroorganizama koji doprinose daljnjem iscrpljivanju kisika, što uzrokuje nepovoljne uvjete za život u vodi (Florescu i sur. 2010). U više od 60% uzoraka vode izmjerene vrijednosti TOC-a bile su veće od 10 mg C/L, a u 15% uzoraka veće od 15 mg C/L, što znači da se ispitivani kanal može smatrati kao vodotok s povećanim sadržajem organskih tvari, a najmanje opterećenje organskom tvari utvrđeno je na postaji S1 koja je najbliža izvoru vodotoka.

Dobri indikatori obogaćenja organskom tvari te indikatori fekalnog zagađenja voda su heterotrofne bakterije (fekalni koliformi, *E. coli* i enterokoki) koje imaju značajnu ulogu u procesu razgradnje organske tvari u vodenom okolišu i dobar su pokazatelj procesa eutrofikacije. Heterotrofne bakterije pokazale su značajnu korelaciju s količinom organske tvari u vodi Odvodnog kanala Karašica. Prema Tchobanoglous i sur. (2003) fekalni streptokoki mogu biti crijevnog porijekla (čovjek izbaci dnevno oko 450 milijuna FS), ali se nalaze i u pojedinim biljkama i biljnim produktima, pa otpadne tvari prehrambene industrije mogu biti nefekalni izvor ovih bakterija. U kombinaciji s fekalnim koliformima mogu pružiti precizniju informaciju o izvoru onečišćenja jer pojedine vrste imaju specifične domaćine. Omjer FK/FS može se upotrijebiti kao pokazatelj fekalnog onečišćenja te može poslužiti u određivanju udaljenosti mjesta uzrokovanja od izvora onečišćenja ili vremena koje je prošlo pri dolasku otpadnih voda fekalnog porijekla na mjesto uzorkovanja (Tchobanoglous i sur., 2003)). Granične vrijednosti mikrobioloških pokazatelja u dodatno pročišćenim komunalnim otpadnim vodama koje se ispuštaju u površinske vode, a koje se koriste za kupanje i rekreaciju za crijevne enterokoke iznose 400 CFU/100 ml, a za *Escherichiu coli* 1000 CFU/100 ml (Narodne novine, 2013b). Osim toga, bakterija *E. coli* pokazatelj je svježeg zagađenja fekalijama, koje je epidemiološki vrlo opasno. Iako se radi o vodotoku koji ima svrhu odvodnje kao prijemnik oborinskih i komunalnih otpadnih voda, u nedostatku drugih propisa, rezultati mjerenja mikrobioloških pokazatelja na istraživanim postajama tumačeni su odnosu na ove standarde. Izuzetno velike vrijednosti enterokoka i *E. coli* na postajama S3 i S7 ukazuju na skorašnje onečišćenje fekalijama. Jedan od uzroka ovako incidentnog onečišćenja može biti neefikasno pročišćavanje komunalnih otpadnih voda

Belog Manastira neposredno prije uzorkovanja u svibnju 2015. godine. Veći omjer FK/FS u uzorcima vode na postaji S3 i S4 ukazuje na onečišćenje svježim fekalnim otpadnim vodama ljudskog podrijetla, što je i očekivano s obzirom na to da se postaja S3 nalazi 1000 m nizvodno od ispusta komunalnih otpadnih voda. S druge strane, na postaji S7 omjer fekalnih koliformnih i streptokoknih bakterija ulazi u sivo područje interpretacije gdje je veća nesigurnost podrijetla bakterija, odnosno vrlo vjerojatno se radi o miješanim otpadnim vodama animalnih i ljudskih fekalija. Postaja S7 je zadnja istraživana postaja na Odvodnom kanalu Karašica, a režim precrcpljivanja vode u potok Karašicu i dalje u Dunav nije stalan, već ovisi o pritjecanju vode. U vrijeme uzorkovanja primijećeno je nakupljanje vode na postaji S7, osobito nakon obilnih oborina u listopadu. Stoga, ovakav rezultat može biti posljedica obilnih oborina koje su osim obilnijeg ispuštanja komunalnih otpadnih voda isprale i odvodne kanale farmi (svinjogojska farma i farma muznih krava) koje se nalaze nizvodno od postaje S5, a uzvodno od postaje S7. Prema tome, problem mikrobiološki narušene kvalitete voda ovog vodotoka nalazi se i u neodgovarajućem ispuštanju otpadnih voda iz pojedinih naselja i farmi, gdje se pojavljuje niz ispusta otpadne vode duž vodotoka uglavnom bez ikakve prethodne obradbe.

S jedne strane, pesticidi su zaslužni za pojačani gospodarski potencijal u smislu povećane proizvodnje hrane i sprječavanje širenja vektorskih bolesti. S druge strane, uporaba pesticida rezultirala je ozbiljnim zdravstvenim posljedicama na čovjeka i njegov okoliš. Danas postoje brojni dokazi da neki od tih spojeva predstavljaju potencijalni rizik za ljude i druge životne oblike te da imaju neželjene nuspojave za okoliš. Povišene koncentracije organoklorovih pesticida izmjerene u Odvodnom kanalu Karašica u Baranji u jesen, direktna su posljedica ispiranja pesticida s poljoprivrednih površina nakon jesenskih oborina. Organoklorovi pesticidi ciklodienske strukture (aldrin, dieldrin, endrin, izodrin, heptaklor) izmjereni su u 96% uzoraka istraživane vode, a bili su povišeni u jesen. Ukupni heksaklorcikloheksani (lindan i izomeri α , β i δ) izmjereni su u 88% uzoraka vode, a također su u vodu dospjeli ispiranjem s okolnog zemljišta. Utvrđene koncentracije koje su bile tri do šest puta veće od standarda predstavljaju opasno stanje za okoliš. DDT i njegovi metaboliti te ukupni endosulfan izmjereni u 38% uzoraka, također su povišeni u jesen, nakon intenzivnih oborina, i vjerojatno su posljedica ispiranja poljoprivrednih površina. Iako je upotreba kontaktnog insekticida DDT-a prestala, u vodi i tlu njegovi metaboliti DDD i DDE se sporo razgrađuju, dok izomer HCH ima bržu razgradnju. Primjerice, ako se DDT nalazi u tlu, potrebno je 25-40 godina da se izgubi 90% primijenjene količine. Karakteristike pesticida,

kao što su visoka lipofilnost, bioakumulacija, dugi poluživot i prijenos na velike udaljenosti, značajno su povećali mogućnost onečišćenja okoliša i više godina nakon prestanka primjene. Osim toga, tragovi ovih spojeva redovito se detektiraju u različitim sastavnicama okoliša, ne samo kao posljedica lokalnog već i kao rezultat globalnog onečišćenja okoliša (Neamtu i sur., 2009; Jayraj i sur. 2016).

Podrijetlo metala u vodi može biti antropogeno i prirodno (geokemijsko). Metali predstavljaju opasnost za sediment, akvatične ekosustave, ali i za ljude zbog izražene sposobnosti adsorbiranja za sediment, perzistentnosti, toksičnosti i sposobnosti bioakumulacije. Tako npr. povećanjem koncentracije željeza dolazi do porasta brzine razgradnje organskih tvari, no nakon određene optimalne koncentracije moguće je smanjenje brzine razgradnje (Kritzberg i Ekström, 2012). Metali kao što su bakar i cink mogu dospjeti u površinske vode jer se često se koriste u održavanju vodovoda (spremnici), u akvakulturi (bakreni sulfat) ili uslijed primjene pesticida. Ovi metali postaju topljivi u kiselim sredinama pa kao takvi su toksični za, primjerice, ribe. Međutim, ako su prijemne vode visokog alkaliteta, većeg pH i sadržaj dostupnih baza je povećan, nastaju manje toksični ili netopivi oblici bakra i cinka. Što se tiče bakra, mjerna postaja s najvećom izmjerenom koncentracijom bila je postaja S4 (Popovac). Naime, to je postaja gdje se neposredno prije mjesta uzorkovanja ispušta voda iz obližnjeg ribnjaka. Također, moguće je da su povišene koncentracije bakra i cinka u rujnu posljedica već prethodno spomenutog akumuliranja vode, odnosno prestanka precrpljivanja vode iz Odvodnog kanala Karašica. Osim toga, utvrđeno je da visoke koncentracije kalcija i magnezija (tvrdoća) mogu blokirati toksično djelovanje bakra i cinka (Bui i sur., 2016; Moynier i sur., 2017). Na toksičnost metala mogu utjecati mnogi okolišni čimbenici, uključujući tvrdoću vode, pH, otopljeni kisik, temperaturu, zamućenost, ugljični dioksid, magnezijeve soli, koncentracije fosfata i helirajuće tvari. Toksičnost može biti potencirana (uvećana) ili atenuirana (umanjena) ovim čimbenicima. Dakle, ovisno o situaciji (klimatski uvjeti, antropogeni utjecaj), specifične onečišćujuće tvari i metali kao zagađivala u vodi Odvodnog kanala Karašica mogu imati različite učinke na akvatičke organizme, što može u konačnici utjecati na procese samopročišćavanja vode.

Degradacija kakvoće vode i vodenih ekosustava, kada se dogodi, ne može se objasniti isključivo na temelju praćenja prioriternih onečišćujućih tvari metodama analitičke kemije. Kemijske analize mogu identificirati tvari i metabolite, ali ne daju informacije o njihovim biološkim i ekološkim učincima. Iako je uvijek teško uspostaviti uzročno posljedičnu vezu

između liste onečišćujućih tvari i bioloških učinaka koje uzrokuju, vrlo je važno prikupljati takve informacije radi bolje procjene utjecaja onečišćenja na slatkovodne ekosustave.

Za dobivanje potpunije slike kvalitete voda Odvodnog kanala Karašica korišten je Lemna-test, kao jedan od najviše korištenih standardnih testova toksičnosti. Krajnja točka ili endpoint funkcionira na određenoj razini složenosti (vremenskoj, prostornoj i dimenzionalnoj) one biološke organizacije koja se koristi u biotestu. Dakle, tipične krajnje točke u Lemna-testu prema razinama složenosti primjene su: boja frondova, procesi poput brzine prijenosa elektrona, fluorescencije klorofila, proizvodnje kisika, potrošnje CO₂, brzine rasta ili brzine udvostručenja biljaka i prinos. Protokoli standardnih testova ističu da se sve promjene u biljkama trebaju promatrati pomoću bilo kojeg mjerljivog parametra. Većina standardnih Lemna-testova preporuča praćenje prirasta broja biljaka i prinosa kao krajnje točke jer se biljke brzo razmnožavaju, a promjene u biomasi su lako uočljive. Prirast broja biljaka i ukupna svježa masa biljaka u Lemna-testu važni su pokazatelji utjecaja onečišćenja u okolišu, budući da vodena leća reagira na različite kemikalije prisutne u vodi iz okoliša (Juneau i sur., 2003; Radić i sur., 2010). Utvrđeno smanjenje svježe mase vodene leće u istraživanim uzorcima posljedica je manjih koncentracija nutrijenata u vodi u odnosu na kontrolni Steinbergov medij, ali i negativnog utjecaja prisutnih onečišćujućih tvari u vodi. Međutim, nizvodno od ispusta otpadnih voda, naročito na postaji S3 u rujnu 2015. godine, utvrđene su visoke koncentracije dušika i fosfora u vodi (slike 13 i 15). S obzirom na nagli reproduktivni kapacitet vodene leće, koja u samo nekoliko tjedana može u potpunosti prekriti cijelu površinu vodnog tijela bogatog nutrijentima, bilo je i očekivano da će rast i ukupna masa biljaka biti najveći u uzorcima s najvećim koncentracijama hranjivih tvari.

Jedan od bioloških parametra koji se mijenja ovisno o kvaliteti vode u kojoj se uzgajaju vodene leće je i sadržaj pigmenata. Sadržaj pigmenata je jednako važan za procjenu vitalnosti kao i broj i prinos biljaka. Okolišni uvjeti značajno utječu na sadržaj i sastav fotosintetskih pigmenata u biljkama (Poorter et al., 2005). U dosadašnjim je istraživanjima uočena značajna povezanost omjera *Chla/Chlb*, intenziteta svjetlosti i dostupnosti dušika (Frak i sur., 2001; Kitajima i Hogan, 2003; Nyongesah Maina i Wang, 2015). U radovima Frak i sur. (2001) i Kitajima i Hogan (2003) utvrđeno je da se koncentracija pigmenata smanjuje, a omjer *Chla/Chlb* povećava smanjenjem koncentracije dušika. Nadalje, Nyongesah Maina i Wang (2015) su utvrdili da prilagodba na izmjenu uvjeta osvjetljenosti ne utječe na omjer *Chla/Chlb*, što je u suprotnosti s dosadašnjom primjenom omjera kao

pokazatelja tolerancije na uvjete sjene kod biljaka. Zapravo je dostupnost dušika glavni pokretač biokemijske plastičnosti. Prema tome, omjer $Chla/Chlb$ može se primjeniti u procjeni stresa na biljkama, osobito ako je istodobno utvrđena međusobna povezanost s koncentracijama dušika. Koncentracije pigmenata $Chla$ izmjerene u biljkama uzgajanim u istraživanim uzorcima vode značajno su manje u odnosu na koncentracije biljaka koje su rasle u kontroli. Dobiveni rezultati ukazuju da izlaganje *L. minor* uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica smanjuje ekspresiju fotosintetskih pigmenata. Klorofil *a* jedan je od najznačajnijih pigmenata u fotosintezi, stoga, smanjena količina $Chla$ može znatno inhibirati fotosintezu. Karotenoidi imaju važnu ulogu u zaštiti klorofila, kao antioksidansi za zaustavljanje ili uklanjanje slobodnih radikala i sprečavanje oštećenja stanica, staničnih membrana (Taiz i Zeiger, 2010), stoga smanjenje koncentracije karotenoida izlaganjem *L. minor* uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica u odnosu na kontrolni medij pokazuje da se osjetljivost biljnog tkiva prema oštećenju značajno povećala.

Uz sadržaj fotosintetskih pigmenata, također su korišteni i pokazatelji za procjenu fizioloških promjena: omjer $Chla/Chlb$ i omjer $Chl(a+b)/Car$. Dokazano je da na sadržaj i omjer fotosintetskih pigmenata mogu utjecati razne tvari prisutne u okolišu poput ksenobiotika, npr. herbicida (Wang i sur., 2016) i teških metala (Appenroth i sur., 2010), koji mogu imati utjecaj na pigmente djelovanjem na određene enzime u njihovom biosintetskom putu. Pozitivna korelacija omjera $Chla/Chlb$ s pesticidima i istovremena negativna korelacija omjera $Chl(a+b)/Car$ i herbicida (tablica 8) ukazuje da prisutni pesticidi u vodi utječu na fiziološke promjene u biljkama preko sadržaja i omjera pojedinih pigmenata. Povećanje vrijednosti omjera $Chla/Chlb$ (u odnosu na kontrolu na svim postajama) ukazuje da dolazi do adaptivnih promjena koje čine PSII manje osjetljivim na stresne uvjete (Zhang i sur., 2016). Također, na svim je postajama (slika 29) omjer $Chl(a+b)/Car$ smanjen u odnosu na kontrolu, što ukazuje na značajno smanjenje ($p < 0,01$) ukupnih klorofila u odnosu na karotenoide. To smanjenje omjera ukupnih klorofila i karotenoida može, s jedne strane, ukazivati na senescenciju, a s druge strane na stres i oštećenje fotosintetskog aparata (jer dolazi do brže razgradnje klorofila u odnosu na karotenoide), Lichtenthaler i Buchmann (2001). Ta niža stopa gubitka karotenoida odražava adaptivnu strategiju biljaka jer karotenoidi imaju ulogu u antioksidacijskoj obrani biljnog organizma (Ebrahimiyan et al., 2013). Prema tome, povećanje omjera $Chla/Chlb$ i smanjenje omjera $Chl(a+b)/Car$ dovodi do porasta efikasnosti fotoprotektivnog sustava u stresnim uvjetima.

U uvjetima stresa (npr. uslijed povišene koncentracije teških metala) dolazi do oksidacije proteina, pri čemu se mijenja konformacija i aktivnost proteina (Stadtman, 2006). Budući da proteini imaju važnu ulogu u staničnoj strukturi i njezinoj regulaciji, prijenosu signala te enzimskim reakcijama (Taiz i Zeiger, 2010), smanjenje koncentracije staničnih proteina može vrlo brzo povećati stresno djelovanje toksikanata, npr. metala ili pesticida te direktno utjecati na metabolizam stanice. Stoga je koncentracija ukupnih proteina u organizmu značajan pokazatelj promjena metabolizma, bilo reverzibilnih ili ireverzibilnih, a kao odgovor na različite stresne čimbenike (Piotrowska i sur., 2010). Koncentracija ukupnih proteina u *L. minor* bila je najmanja u uzorcima vode iz rujna 2015. godine sa postaje S2, gdje je utvrđena i najmanja svježa masa biljaka u odnosu na kontrolu (slika 25) te povećana količina MDA (slika 23 i 24 B). Smanjeni prirast svježe mase biljaka i smanjena koncentracija ukupnih topljivih proteina *L. minor* može se povezati s nepovoljnim abiotičkim čimbenicima u vodi s postaje S2 (najmanje koncentracije nutrijenata i najveće koncentracije DDT-a i metabolita te najveće vrijednosti ciklodienskih pesticida, slike 19 i 20).

S druge strane, *L. minor* uzgajana u uzorcima vode s postaje S3 izdvajala se po najvećoj koncentraciji proteina u odnosu na kontrolu (slika 24 A), što je vjerojatno uvjetovano najvećim vrijednostima dušika i fosfora u vodi te postaje (slike 13 A i 15 C). Dušik je za biljke značajan kao sastojak nukleinskih kiselina, proteina, klorofila, hormona i koenzima, a biljci je dostupan kao NH_4^+ , NO_3^- te N_2 oblik (Pevalek Kozlina, 2003). Značajna pozitivna korelacija između proteina u *L. minor* i koncentracije $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ u vodi Odvodnog kanala Karašica ukazuje na važnu ulogu dušika u izgradnji biljnog organizma. Dakle, povećanje sadržaja nutrijenata može uzrokovati povećanje biomase biljaka, ali i utjecati na umanjenje toksičnog učinka. Niske razine nutrijenata u vodi, s druge strane mogu utjecati na povećanje toksičnosti zbog dodatnog stresa kao posljedice manjka nutrijenata. Većina pesticida prolazi kroz brojne faze degradacije, uključujući fiziokemijske reakcije poput autolize, preraspodjele i inaktivacije prilikom vezanja na tlo i makromolekule u biljci, što dovodi do stvaranja ROS-a (Mahmood i sur., 2014). Ukoliko biljka nije u stanju enzimatski i/ili neenzimatski ukloniti ROS, povećani stupanj lipidne peroksidacije uvjetuje promjene na staničnim membranama i u konačnici dolazi do stanične smrti, a jedan od završnih produkata lipidne peroksidacije, MDA pokazatelj je oštećenja (Labuda, 2013). Gotovo svi uzorci voda izazvali su značajno oštećenje lipidne komponente stanične membrane *L. minor* (slika 34). Značajnim povišenjem sadržaja MDA izdvaja se *L. minor* uzgajana u vodi s postaje S2 za

razliku od postaje S3, gdje je količina MDA bila najmanja, što ide u prilog teoriji potenciranja odnosno umanjenja toksičnosti zbog različitih okolišnih čimbenika (Holmstrup i sur., 2010). Također, pozitivna korelacija između MDA i ukupnih izmjerenih HCH (heksaklorcikloheksana) te MDA i OCP-a (organoklorovig pesticida), ukazuje na moguće štetno djelovanje ovih spojeva na vodene leće. Proces lipidne peroksidacije je jedan oblik oksidativne promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom citotoksičnih produkata, a jedan od njih je MDA (Štefan i sur., 2007). MDA je prihvaćeni pokazatelj lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidativnog stresa. Prema tome, lipidna peroksidacija ukazala je na indukciju oksidacijskog stresa u vodenoj leći u gotovo svim uzorcima vode Odvodnog kanala Karašica. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je postignuta preciznija procjena učinka voda Odvodnog kanala Karašica uporabom Lemna-testa kojemu je cilj bio odrediti promjene na staničnoj razini, prateći rast, razvoj i enzimatske procese (poput lipidne peroksidacije) koje nastaju uslijed opterećenja voda antropogenim i prirodnim uzrocima.

U većini bitestova u literaturi, pa čak i u standardnom Lemna-testu, koncentracije hranjivih tvari, kao i testnih tvari, su znatno veće od razine hranjivih tvari koje se nalaze u prirodnom okolišu. Da bi prevladali neka od ograničenja koja se odnose na ovaj problem, u svom radu Mkandawire i sur. (2005) su izmijenili standardnu otopinu hranjivih tvari prema koncentracijama blizu prirodnih na temelju termodinamičkog modeliranja i literaturnim podacima o kemiji vode istraživanog područja. Tako dobiveni rezultati bili su tada usporedivi s onima dobivenim na terenu u prirodnim uvjetima. Lemna-test se do sada intenzivno koristio za procjenu toksičnosti pojedinih kemikalija (Perreault i sur., 2010; Begović i sur., 2016), ali i procjednih i otpadnih voda odlagališta i industrije (Juneau i sur., 2003; Radić i sur., 2010) te za procjenu rizika korištenja pesticida i herbicida u vodi, tlu i sedimentu (Rosenkrantz i sur., 2013; Park i sur., 2017).

Rezultati ovog rada su pokazali da je *L. minor* robustan bioindikator mogućeg onečišćenja u prirodnom okolišu. Ali, da bi se povećala točnost predikcije Lemna-testa u procjeni kvalitete površinskih voda s obzirom na kompleksnost vode, Lemna-test treba provesti na različitim razinama složenosti. Osim toga, potrebno je uzeti u obzir doprinos interakcije između sadržaja hranjivih tvari i onečišćenja. Samo na taj način moguće je poboljšati preciznost predviđanja ekotoksičnosti i učiniti test reprezentativnim za potencijalno zahvaćene organizme u testiranom sustavu.

5. Zaključci

Kvaliteta vode Odvodnog kanala Karašica pod jakim je antropogenim utjecajem (poljoprivreda, komunalne otpadne vode), a unos zagađivala u vodotok ovisio je i o sezonskim promjenama klimatskih parametara.

Značajne promjene u specifičnoj vodljivosti prije i nakon ispusta pokazatelj su ulaska otpadnih voda. Također, povećani sadržaj organske tvari i smanjena zasićenost vode kisikom nakon ispusta komunalnih otpadnih voda pokazatelji su neodgovarajućeg ispuštanja otpadnih voda iz pojedinih naselja i farmi.

Mikrobiološki pokazatelji (enterokoki i *E. coli*) ukazuju na svježije fekalno onečišćenje na postajama opterećenim otpadnim vodama, dok je prisutnost specifičnih onečišćujućih tvari (organoklorovi pesticidi, heksaklorcikloheksani te DDT i metaboliti) i metala kao zagađivala u kanalu najviše bila posljedica ispiranja s poljoprivrednih površina, posebno u jesen.

Odabrani parametri u Lemna-testu (prirast i svježja masa biljaka, fotosintetski pigmenti, ukupni topljivi proteini i malondialdehid) dobri su pokazatelji utjecaja zagađivala prisutnih u istraživanoj vodi Odvodnog kanala Karašica na *L. minor*.

Niske razine hranjivih tvari u vodi, posebno dušika i visoke razine zagađivala (DDT-a i metabolita te ciklodienskih pesticida) uvjetovali su stres u *L. minor* indukcijom lipidne peroksidacije u gotovo svim uzorcima vode Odvodnog kanala. Također, u stresnim je uvjetima došlo do povećanja omjera Chl_a/b i smanjenja omjera Chl_(a+b)/Car, smanjene koncentracije ukupnih proteina i svježje mase biljaka *L. minor*.

Uporabom Lemna-testa na različitim razinama složenosti (morfološke promjene, pigmenti, proteini i lipidna peroksidacija) postignuta je preciznija procjena učinka realnih uzoraka vode iz okoliša.

6. LITERATURA

Ahearn, D. S., Sheibley, R. W., Dahlgren R. A., Anderson, M., Johnson J., Tate, K. W. (2005) Land use and land cover influence on water quality in the last free-flowing river draining the western Sierra Nevada, California. *Journal of Hydrology* 313: 234–247.

Adhikari U., Harrigan T., Dawn, M. R. (2014) Use of duckweed-based constructed wetlands for nutrient recovery and pollutant reduction from dairy wastewater. *Ecol. Eng.* Ambriović Ristov, A. (2007) *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Aktar, M. W., Sengupta D., Chowdhury, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1): 1–12.

Appenroth, K.-J., Krech, K., Keresztes, Á. Fischer, W., Koloczek, H. (2010) Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation, *Chemosphere* 78(3): 216-223.

Babić, M., Radić, S., Cvjetko, P., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M. (2009) Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquatic Botany* 91: 166–172.

Balen, B. (2016) Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. *Educatio Biologiae* 2: 115-131.

Bognar A. (1990) *Geomorfologija Baranje*. Savez geografskih društava Hrvatske, Zagreb. 312 str.

Bayram, A., Önsoy, H., Akinci, G., Bulut, V. N. (2011) Variation of total organic carbon content along the stream Harsit, Eastern Black Sea Basin, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 182: 85–95.

Begović, L., Mlinarić, S., Antunović Dunić J., Katanić Z., Lončarić Z., Lepeduš, H., Cesar, V. (2016) Response of *Lemna minor* L. to short-term cobalt exposure: The effect on photosynthetic electron transport chain and induction of oxidative damage. *Aquatic Toxicology* 175: 117-126.

Belgers, J. D. M., Van Lieverloo, R. J., Van der Pas, L. J. T., Van den Brink, P. J. (2007) Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* 86: 260–268.

Boyd, C.E. (2015) *Water Quality: An Introduction*. Springer, Dodrecht.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bui, T.K.L., Do-Hong, L.C., Dao, T.S., Hoang, T.C. (2016) Copper toxicity and the influence of water quality of Dongnai River and Mekong River waters on copper bioavailability and toxicity to three tropical species. *Chemosphere* 144: 872–878.

- Chapman, D. (1996) *Water Quality Assessments: A guide to use Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*. Second Edition. E & FN Spon, London UK.
- Chapra, S.C., 2008. *Surface Water-quality Modeling*. Waveland Press, INC. Long Grove Illinois, 844 pp.
- Christen, O., Theuer, C. (1996) Sensitivity of *Lemna* bioassay interacts with stock-culture period. *Journal of Chemical Ecology* 22(6): 1177–1186.
- Czaplicka-Kotas, A., Lodowska, J. (2014) Biomonitoring of surface water by synchronous culture of *Chlorella vulgaris* algae. *Environment Protection Engineering* 40: 29-40.
- Davy M., Petrie R., Smrcek J., Kuchnicki T., Francois D. (2001) Proposal to update non-target plant toxicity testing under NAFTA, USEPA, Washington DC, 158 pp.
- Diamantini, E., Lutz, S., Mallucci, S., Majone, B., Merz, R., Bellini, A. (2018) Driver detection of water quality trends in three large European river basins. *Science of The Total Environment* 612: 49-62.
- Dodds, W. K. (2007) Trophic state, utrophication and nutrient criteria in streams. *Trends in Ecology and Evolution* 22(12): 669-676.
- Doğanlar, Z. B. (2013) Metal accumulation and physiological responses induced by copper and cadmium in *Lemna gibba*, *L. minor* and *Spirodela polyrhiza*. *Chemical Speciation & Bioavailability* 25(2): 79-88.
- Du, J., Gridneva, Z., Gay, M. C. L., Lai, C. T., Trengove, R. D., Hartmann, P. E., Geddes, D. T. (2016) Longitudinal study of pesticide residue levels in human milk from Western Australia during 12 months of lactation: Exposure assessment for infants. *Scientific Reports* 6:38355.
- Ebrahimiyan, M., Majidi, M. M., Mirlohi, A., and Noroozi, A. (2013) Physiological traits related to drought tolerance in tall fescue. *Euphytica* 190(3): 401–414.
- European Commission (1991) Council Directive 91/676/EEC of 12 December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. *Official Journal L 375: 1 – 8*.
- European Commission (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal L 327: 1 – 73*.
- Florescu, D., Ionete, R.E., Sandru, C., Iordache, A. and Culea, M. (2010). The influence of pollution monitoring parameters in characterizing the surface water quality from Romania southern area. *Romanian Journal of Physics*. 56: 1001-1010.
- Frak, E., Le Roux, X., Millard, P., Dreyer, E., Jaquen, G., Saint-Joanis, B., Wendler, R. (2001) Changes in total leaf nitrogen and partitioning of leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. *Plant, Cell and Environment* 24: 1279–1288.

Gutteridge, J. M. C. (1995) Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry* 41/12: 1819-1828.

Hanson, M. L., Sibley P. K., Mabury, S. A., Muir, D. C. G., Solomon, K. R. (2003) Field level evaluation and risk assessment of the toxicity of dichloroacetic acid to the aquatic macrophytes *Lemna gibba*, *Myriophyllum spicatum*, and *Myriophyllum sibiricum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55(1): 46-63.

Haarstad, K., Bavor, H. J., Mæhlum, T. (2012) Organic and metallic pollutants in water treatment and natural wetlands: a review. *Water Science & Technology* | 65.1.

Heath, R.L., Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1): 189-198.

Hering, S. V., Spielman, S. R., Lewis, G. S. (2014) Moderated, Water-Based, Condensational Particle Growth in a Laminar Flow. *Aerosol Science and Technology* 48(4): 401–408.

Holmstrup M., Bindsbol A-M., Oostinhh G.J., Duschl A., Scheil V., Köhler H-R., Loureiro S., Soares A.M.V.M., Ferreira A.L.G., Kienle C., Gerhardt A., Laskowski R., Kramarz P.E. Aayley M., Svendsen C., Spurgeon D.J (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors. A review: *Science of The Total Environment* 408: 3746-3762.

Hulsen, K., Minne, V., Lootens, P., Vandecasteele, P., Höfte, M. (2002) A chlorophyll a fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron. *Environmental Microbiology* 4(6): 327-37.

Iatrou, E. I., Gatidou, G., Damalas, D., Thomaidis, N. S., Stasinakis, A. S. (2017) Fate of antimicrobials in duckweed *Lemna minor* wastewatertreatment systems. *Journal of Hazardous Materials* 330: 116–126.

Iticescu C., Georgescu, L. P., Topa, C., Murarin, G. (2014) Monitoring the danube water quality near the galati city. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 15 (1): 30–38.

ISO 20079, 2005. Water quality – determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) – duckweed growth inhibition test.

Jarvie, H. P., Neal, C., Withers, P. J. A. (2006) Sewage-effluent phosphorus: A greater risk to river eutrophication than agricultural phosphorus? *Science of the Total Environment* 360: 246– 253.

Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P. (2016) Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. Review article. *Interdisciplinary Toxicology* 9 (3–4): 90-100.

Juneau, P., Sumitomo, H., Matsui, S., Itoh, S., Kim, S.G., Popovic, R., (2003) Use of chlorophyll fluorescence of *Closterium ehrenbergii* and *Lemna gibba* for toxic effect evaluation of sewage treatment plant effluent and its hydrophobic components. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 1-8.

- Kanoun-Boulé, M., Vicente, J. A. F., Nabais, C, Prasad, M. N. V., Freitas, F. (2009) Ecophysiological tolerance of duckweed exposed to copper. *Aquatic Toxicology* 91(1): 1-9.
- Kinani, A., Kinani, S., Bouchonnet, S. (2016) Formation and determination of organohalogen by-products in water. Part III. Characterization and quantitative approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 85: 295-305.
- Kitajima, K. and Hogan, K. (2003) Increases of Chlorophyll a/b Ratios during Acclimation of Tropical Woody Seedlings to Nitrogen Limitation and High Light. *Plant, Cell & Environment* 26: 857-865.
- Kritzberg, E. S., and S. M. Ekström (2012), Increasing iron concentrations in surface waters—A factor behind brownification? *Biogeosciences* 9: 1465–1478.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. (2015) Photosynthetic Pigments in Diatoms. Review. *Marine Drugs* 13 (9): 5847-5881.
- Krajncić B., Devidé Z., (1980). Report on photoperiodic response in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich*, 47: 75-86.
- Kumar, K. S., Han, T. (2010) Physiological Response of *Lemna* Species to Herbicides and Its Probable Use in Toxicity Testing. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 2 (1): 39-49.
- Kumar, A., Dhall, P., Kumar, R. (2010) Redefining BOD:COD ratio of pulp mill industrial wastewaters in BOD analysis by formulating a specific microbial seed. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64 (3): 197-202.
- Labudda, M. (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland.
- Lahive, E., Halloran, J.O., Jansen, M.A.K. (2011) Differential sensitivity of four Lemnaceae species to zinc sulphate. *Environmental and Experimental Botany* 71: 25–33.
- Lee, J., Lee, S., Yu, S., Rhew, D. (2016) Relationships between water quality parameters in rivers and lakes: BOD₅, COD, NBOPs, and TOC. *Environmental Monitoring and Assessment* 188 (252):1-8.
- Liao, H., Sarver, E., Krometis, L.-A. H. (2018) Interactive effects of water quality, physical habitat, and watershed anthropogenic activities on stream ecosystem health. *Water Research* 130: 69-78.
- Lichtenthaler HK. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382.
- Lichtenthaler, H.K., Buchmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1-F4.3.8
- Lidman, F., Boily Å., Laudon, H., Köhler, S. K. (2017) From soil water to surface water – how the riparian zone controls element transport from a boreal forest to a stream. *Biogeosciences* 14: 3001–3014.

- Liu, C., Feng, Q., Yang, J., Qi, X. (2018) Catalytic production of levulinic acid and ethyl levulinate from uniconazole-induced duckweed (*Lemna minor*). *Bioresource Technology* 255: 50-57.
- Little, S. H., Vance, D., Walker-Brown, C., Landing, W. M. (2014) The oceanic mass balance of copper and zinc isotopes, investigated by analysis of their inputs, and outputs to ferromanganese oxide sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 125: 673–693.
- Mahmood, A., Malik, R. N., Li, J., Zhang, G. (2014) Human health risk assessment and dietary intake of organochlorine pesticides through air, soil and food crops (wheat and rice) along two tributaries of river Chenab, Pakistan. *Food and Chemical Toxicology* 71: 17-25.
- Malec, P., Makva, M., Majeti, P., Strzalka, H. (2010) Responses of *Lemna trisulca* L. (Duckweed) exposed to low doses of cadmium: thiols, metal binding complexes, and photosynthetic pigments as sensitive biomarkers of ecotoxicity. *Protoplasma* 240(1-4): 69-74.
- Matamoros, V., Nguyen, L. X., Arias, C. A., Salvadó, V., Brix, H. (2012) Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: A microcosm experiment. *Chemosphere* 88: 1257–1264.
- Mkandawire, M., Brackhage, C., Taubert, B., and Dudel, E. G. (2005). Semicontinuous culture system for *Lemna gibba* bioassay: Functioning and theory of operation. *Applied Ecology and Environmental Research* 3, 19–27.
- Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., Dudel, E. G. (2014) The *Lemna* Bioassay: Contemporary Issues as the Most Standardized Plant Bioassay for Aquatic Ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44: 154–197.
- Moynier, F., Vance, D., Fujii, T., Savage, P. (2017) The Isotope Geochemistry of Zinc and Copper. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 82(1): 543-600.
- Nacar S., Satilmis U., (2017) Temporal Variation of Organic and Inorganic Carbon Transport from the Southeastern Black Sea (Trabzon Province) Rivers, *European Journal of Engineering and Natural Sciences*, 2: 149-153.
- Narodne novine (2010) Odluka o popisu voda 1. reda. Zagreb, Narodne novine d.d. 79: 2264.
- Narodne novine (2013a) Uredba o standardu kakvoće voda. Zagreb, Narodne novine d.d. 73:1463.
- Narodne novine (2013b) Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Zagreb, Narodne novine d.d. 80:1881.
- Narodne novine (2014) Šesto nacionalno izvješće Republike Hrvatske prema Okvirnoj konvenciji UN-a o promjeni klime. Narodne novine d.d., Zagreb 18: 1-163.
- Neamtu, M, Ciumasu, I. M., Costica, N., Costica, M., Bobu, M., Nicoara, M. N., Catrinescu, C., van Slooten, K. B., De Alencastro, L. F. (2009) Chemical, biological, and ecotoxicological assessment of pesticides and persistent organic pollutants in the Bahlui River, Romania. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 76-85.

- Nielsen, E. P., Geiker, M. R. (2003) Chloride diffusion in partially saturated cementitious material *Cement and Concrete Research* 33(1):133-138.
- Niemirycz, E., Gozdek, J., Koszka-Maróń, D. (2006) Variability of Organic Carbon in Water and Sediments of the Odra River and Its Tributaries. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(4): 557-563.
- Noble, R. T., Moore, D. F., Leecaster, M. K., McGee, C.D., Weisberg, S.B. (2003) Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research* 37: 1637–1643.
- Nyongesah Maina, J., Wang, O. (2015) Seasonal Response of Chlorophyll *a/b* Ratio to Stress in a Typical Desert Species: *Haloxylon ammodendron*. *Arid Land Research and Management* 29(3): 321-334.
- OECD (2006), *Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, No. 190, OECD Publishing, Paris.
- Park, A., Kim, Y.- J., Choi, E.-M., Brown, M. T., Han, T. (2013) A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*. *Aquatic Toxicology* 140– 141: 415– 424.
- Park, J., Brown, M. T., Depuydt, S., Kim, J. K., Won, D.-S., Han, T. (2017) Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three *Lemna* species exposed to four herbicides. *Environmental Pollution* 220: 818-827.
- Pevalek-Kozlina B. (2003) *Fiziologija bilja*. Zagreb, Profil.
- Petruck, A., Stöffler, U. (2011) On the history of chloride concentrations in the River Lippe (Germany) and the impact on the macroinvertebrates. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 41(2): 143-150.
- Perreault, F., Oukarroum, A., Pirastru, L., Sirois, L., Matias, W. G., Popovic, R. (2010) Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll *a* Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. *Journal of Botany* Vol 2010: 1-9.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Czerpak, R., Kot, K. (2010) Changes in the Growth, Chemical Composition, and Antioxidant Activity in the Aquatic Plant *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae) Exposed to Jasmonic Acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 29(1): 53-62.
- Pirson A., Seidel F. (1950) Zell- und stoffwechselfysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Calciummangel. *Planta* 38: 431-473.
- Price, J. R., Ledford, S. H., Ryan, M. O., Toran, L., Sales, C. M. (2018) Wastewater treatment plant effluent introduces recoverable shifts in microbial community composition in receiving streams. *Science of The Total Environment* 613-614: 1104-1116.
- Radić S., Stipančev D., Cvjetko P., Lovrenčić Mikelić I., Marijanović Rajčić M., Širac S., Pevalek-Kozlina B., Pavlica M. (2010) Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor*) L. as a test organism. *Ecotoxicology* 19(1): 216-222.

- Radić S., Stipančev D., Cvjetko P., Marijanović Rajčić M., Širac S., Pevalek-Kozlina B., Pavlica M. (2011) Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 182–187.
- Radić, S., Medunić, G., Kuharić, Ž., Roje, V., Maldini, K., Vujčić, V., Krivohlavek, A. (2018) The effect of hazardous pollutants from coal combustion activity: Phytotoxicity assessment of aqueous soil extracts. *Chemosphere* 199: 191-200.
- Ramírez, A., Rosas, K. G., Lugo, A. E., Ramos-González, O. M. (2014) Spatio-temporal variation in stream water chemistry in a tropical urban watershed. *Ecology and Society* 19(2): 1-12.
- Reimann, C., Filzmoser, P., Garrett, R., Dutter, R. (2008). *Statistical data analysis explained: Applied environmental statistics with R*. Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Reinhold, D., Vishwanathan, S., Park, J. J., Oh, D., Saunders, F. M. (2010) Assessment of plant-driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chemosphere* 80: 687–692.
- Rio, M., Salles, C., Rodier, C., Cantet, F., Marchand, P., Mosser, T., Cernesson, F., Monfort, P., Tournoud, M.-G. (2017) An empirical model to quantify fecal bacterial loadings to coastal areas: Application in a Mediterranean context. *Comptes Rendus Geoscience* 349: 299–309.
- Rosenkrantz, R. T., Baun, A., Kusk, K. O. (2013) Growth inhibition and recovery of *Lemna gibba* after pulse exposure to sulfonylurea herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89: 89-94.
- Saulnier, I., Mucci, A. (2000) Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Applied Geochemistry* 15: 191-210.
- Scherr, C., Simon, M., Spranger, J., Baumgartner, S. (2008) Test System Stability and Natural Variability of a *Lemna gibba* L. Bioassay. *PLOS ONE* 3(9): e3133.
- Szczerbińska, N., Gałczyńska, M. (2015) Biological methods used to assess surface water quality. *Archives of Polish Fisheries* 24: 185-196.
- Sparks, D. L. (2001) Elucidating the fundamental chemistry of soils: past and recent achievements and future frontiers. *Geoderma* 100: 303–319.
- Sree, K. S., Keresztes, Á., Mueller-Roeber, B., Brandt, R., Eberius, M., Fischer, W., Appenroth, K.-J. (2015) Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed *Lemna minor*-Morphology, ion uptake, and starch accumulation. *Chemosphere* 131: 149–156.
- Stadtman E. R. 2006. Protein oxidation in aging and age related diseases. *Annals of New York Academy of Science*, vol. 928: 22-38.
- Steinberg R. (1946) Mineral requirement of *Lemna minor*. *Plant Physiology* 21:42-48.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidović, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Pregledni rad. Medicina* 43: 84-93.

- Taiz, L. and Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. I., Stensel, H. D. (2003) *Wastewater engineering: Treatment and reuse* (4th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Vance, D., Archer, C., Bermin, J., Perkins, J., Statham, P. J., Lohan, M. C., Ellwood, M. J., Mills, R. A. (2008) The copper isotope geochemistry of rivers and the oceans *Earth Planet. Sci. Lett.* 274 (1–2): 204-213.
- Van der Hoven, C., Ubomba-Jaswab, E., Van der Merwea, B., Loubsera, M., Abia, A.L.K. (2017) The impact of various land uses on the microbial and physicochemical quality of surface water bodies in developing countries: Prioritisation of water resources management areas. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 8: 280–289.
- Van Hoeck, A., Horemans, N., Monsieurs, P., Cao, H. X., Vanderhove, H., Blust, R. (2015) The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnology for Biofuels* 8:1-13.
- Varga, M., Horvatić, J., Čelić, A. (2013) Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. *Central European Journal of Biology* 8(11): 1083-1093.
- Voulvoulis, N., Arpon, K. D., Giakoumis, T. (2017) The EU water framework directive: from great expectations to problems with implementation *Science of The Total Environment* 575: 358-366.
- Vidaković-Cifrek, Ž., Tkalec, M., Šikić, S., Tolić, S., Lepeduš, H., Pevalek-Kozlina, B. (2015) Growth and photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to cadmium in combination with zinc or copper. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 66 (2):141-52.
- Villeneuve, V., Légaré, S., Painchaud, J., Vincent, W. (2006) Dynamics and modelling of dissolved oxygen in rivers. *Revue des Sciences de l'Eau* 19(4): 259-274.
- Wang, W. (1992) Use of plants for the assessment of environmental contaminants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 126: 87-127 (1992).
- Wang, F., Liu, D., Qu, H., Chen, L., Zhou, Z., Wang, P. (2016) A full evaluation for the enantiomeric impacts of lactofen and its metabolites on aquatic macrophyte *Lemna minor*. *Water Research* 101: 55-63.
- Wetzel, P. R., Sklar, F. H., Coronado, C. A., Troxler, T. G., Krupa, S. L., Sullivan, P. L., Ewe, S., Price, R. M., Newman, S. M., Orem, W. H. (2011) Biogeochemical processes on tree islands in the Greater Everglades: Initiating a new paradigm. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41: 670–701.
- Withers, P. J. A., Jarvie, H. P. (2008) Delivery and cycling of phosphorus in rivers: A review. *Science of the Total Environment* 400: 379-395. World health statistics (2014). World Health Organization, Geneva, Switzerland 1-180.

Yu, X., Zou, Y., Jiang, M., Lu, X., Wang, G. (2011) Response of soil constituents to freeze–thaw cycles in wetland soil solution. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (6): 1308-1320.

Yustiani, Y. M., Komariah, I. (2017) Investigation on the biodegradation capacity of urban rivers in Jakarta, Indonesia. *International Journal of GEOMATE* 12(34): 45-50.

Zezulka, Š., Kummerová, M., Babula, P., Váňová, L. (2013) *Lemna minor* exposed to fluoranthene: Growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic Toxicology* 140–141: 37–47.

Žaltauskaitė J., Norvilaitė R. (2013) Phytotoxicity of amidosulfuron (sulfonylureas herbicide) to aquatic macrophyte *Lemna minor* L. *Biologija*. 59(2): 165–174.

Web izvori:

Web 1. Europska agencija za okoliš (EEA): Europsko izvješće o okolišu – stanje i izgledi 2015: Sinteza. (11.3.2018.)

http://knjiznica.sabor.hr/pdf/E_publicacije/Europsko_izvjesce_o_okolisu_2015.pdf (11.3.2018.)

Web 2. Provedbeni plan obrane od poplava branjenog područja sektor B - Dunav i donja Drava. Branjeno područje 16: područje malog sliva Baranja. (2014) Hrvatske vode. (5.11.2017.)

http://www.voda.hr/sites/default/files/clanak/bp_16_-_provedbeni_plan_obrane_od_poplava.pdf (11.3.2018.)

Web 3. Baranjski vodovod d.o.o. za vodoopskrbu i odvodnju: Odvodnja. <http://www.baranjski-vodovod.hr/odvodnja.aspx> (5.11.2017.)

Web 4. DHMZ http://klima.hr/ocjene_arhiva.php (9.3.2018.)