

Instrumentne metode analize pri određivanju antropogenih zagađivača u vodama Nacionalnog parka Plitvička jezera

Krajina, Natko

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:165966>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Natko Krajina

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**Instrumentne metode analize pri određivanju
antropogenih zagađivača u vodama
Nacionalnog parka Plitvička jezera**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Neposredni voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. ožujka 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Potpis:

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| § SAŽETAK | VI |
| § 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Spektrometrija mase uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) | 1 |
| § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME | 8 |
| 2.1. Uvod u temu istraživanja | 8 |
| 2.2. Materijali i metode | 10 |
| 2.2.1. <i>Mjesto istraživanja</i> | 10 |
| 2.2.2. <i>Uzimanje uzoraka</i> | 12 |
| 2.2.3. <i>Kemijska analiza uzoraka</i> | 12 |
| 2.2.4. <i>Ispitivanje genotoksičnosti vode</i> | 15 |
| 2.3. Rezultati | 17 |
| 2.3.1. <i>Sadržaj spojeva BTEX u vodi</i> | 17 |
| 2.3.2. <i>Sadržaj mikro- i makroelemenata u vodi</i> | 18 |
| 2.3.3. <i>Sadržaj antropogenih radionuklida u vodi</i> | 21 |
| 2.3.4. <i>Genotoksični potencijal vode</i> | 22 |
| 2.4. Zaključak | 24 |
| § 3. LITERATURNI IZVORI | 25 |

§ Sažetak

Korištenjem instrumentnih metoda kemijske analize (ICP-MS, GC-MS, gama spektrometrija) i citogenetičke analize (SCGE) istražena je razina antropogenog utjecaja na kvalitetu voda Nacionalnog parka Plitvička jezera u razdoblju od 2011. do 2012. godine. U vodama je određen sadržaj triju velikih skupina zagađivača: hlapljivih organskih zagađivača (spojeva BTEX), makroelemenata i elemenata u tragovima (tj. teških metala, određenih unutar elementne analize) i antropogenih radionuklida. Koncentracije većine elemenata u vodi su niske, a prosječne koncentracije elemenata koji predstavljaju opasnost po vodeni ekosustav su znatno niže od maksimalnih dozvoljenih koncentracija propisanih direktivom Parlamenta i Vijeća EU. Razine spojeva BTEX vrlo su niske i odgovaraju razinama koje se obično uočavaju u područjima „netaknute prirode“. Analizom antropogenih radionuklida uočene su povišene koncentracije cezija-137 i kratkoživućeg cezija-134, vjerojatno kao posljedica nuklearne katastrofe koja se dogodila u Fukushimi u ožujku 2011. Moguća genotoksičnost riječne i jezerske vode NP Plitvička jezera ispitana je alkalnim komet-testom (metodom SCGE) ljudskih krvnih limfocita te su uočene razine oštećenja DNA unutar prihvatljivih granica. Rezultati istraživanja su pokazali da su antropogeni utjecaji na kvalitetu vode, a time i na vodeni ekosustav nacionalnog parka, mali, ali postoje, pa bi bilo preporučljivo daljnje praćenje kvalitete vode kako bi se osiguralo zadržavanje postojećih niskih razina onečišćenja te kako bi se na vrijeme mogao opaziti njihov porast i spriječiti ozbiljnije posljedice po vodeni ekosustav.

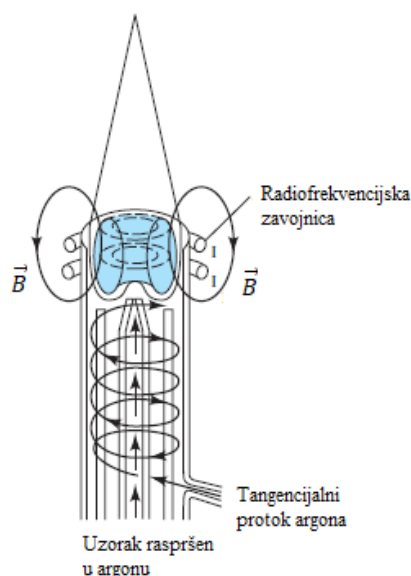
§ 1. UVOD

1.1. Spektrometrija mase uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS)

Spektrometrija mase uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) jedna je od najvažnijih metoda elementne analize biomedicinskih, geokemijskih i uzoraka iz okoliša – i to na različitim razinama: od rutinske višeelementne analize do specijacije elemenata prisutnih u tragovima uz korištenje tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti.¹

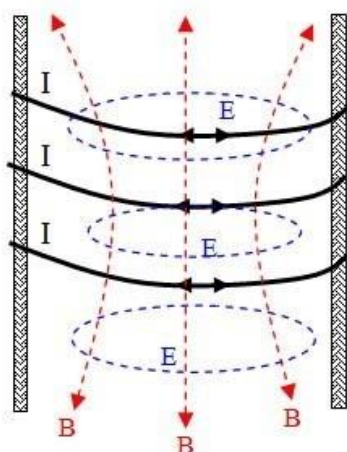
Prednosti metode ICP-MS za elementnu analizu su vrlo niske granice detekcije (tipično od 0,1 do 10 ppb), selektivnost, zadovoljavajuća točnost i preciznost, brzina provođenja analize te jednostavnost spektara u usporedbi s onima dobivenim metodama koje se temelje na optičkim spektroskopijama² poput plamene atomske spektroskopije (FAAS), elektrotermičke atomske spektroskopije (ETAAS) ili optičke spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES).

Plazma je, po definiciji, električki vodljiva plinska smjesa koja sadrži znatne koncentracije kationa i elektrona, pri čemu je ukupni naboj smjese nula. U metodi ICP-MS koristi se argonska plazma u kojoj su glavne vodljive vrste ioni argona (Ar^+) i elektroni, a manji doprinos ukupnoj vodljivosti plazme daju i ioni uzorka. Induktivno spregnuta plazma dobije se uvođenjem argona u jako oscilirajuće magnetsko polje koje proizvodi radiofrekvencijska zavojnica spojena na izvor izmjenične struje. Ionizacija struje argona potiče se iskrom iz Tesline zavojnice, a dalje napreduje spontano kolizijom izbačenih elektrona iz atoma argona.³



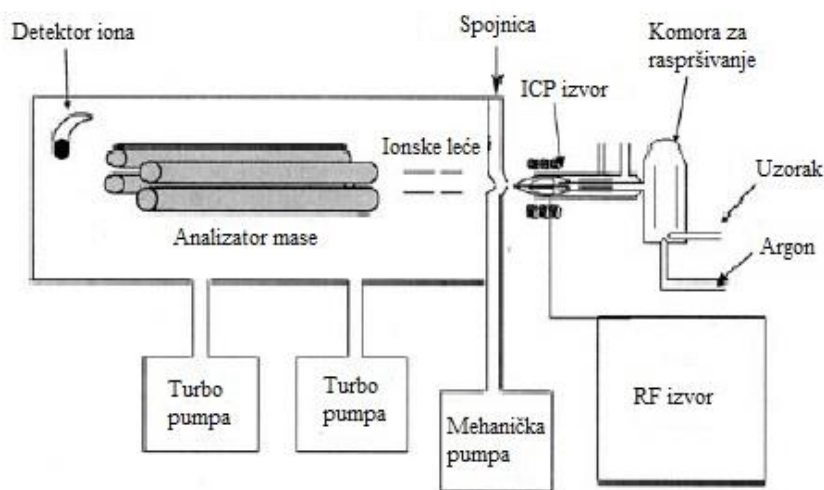
Slika 1. Induktivno spregnuta plazma

Izvor induktivno spregnute plazme, prikazan na Slici 1,³ sastoji se od tri koncentrične kvarcne cijevi kroz koje prolazi struja argona. Promjer vanjske cijevi je obično oko 2,5 cm. Kroz najužu cijev prolazi smjesa uzorka raspršenog u obliku finog aerosola u argonu brzinom od približno 1 L min^{-1} . Između vanjske i središnje cijevi tangencijalno protječe argon brzinom od 12 do 17 L min^{-1} i ta struja služi formiranju plazme. Između unutrašnje i središnje cijevi protječe tzv. pomoćna struja argona i služi za ugađanje položaja baze plazme. Vrh svih triju cijevi obavijen je radiofrekvencijskom zavojnicom kojom prolazi izmjenična struja frekvencije 27 MHz ili 40 MHz.³ Prolaskom izmjenične struje (I) kroz zavojnicu na vrhu cijevi djeluje snažno oscilirajuće magnetsko polje (\vec{B}). Prema Faradayevom zakonu, zbog vremenski promjenjivog magnetskog toka kroz ravninu otvora cijevi, u plazmi se inducira elektromotorna sila i pripadno oscilirajuće električno polje (\vec{E}) koje ubrzava naboje u plazmi⁴ u ravnini otvora cijevi te koji se posljedično kreću u ravnini po zatvorenim kružnim putanjama (smjerovi struje i vektora polja sila dani su na Slici 2)⁴. Otpor elektrona i kationa tom kružnom gibanju uzrokuje Ohmsko zagrijavanje plazme.



Slika 2. Smjerovi izmjenične struje (I) kroz zavojnicu i vektori polja sila (\vec{B} , \vec{E}) koje djeluju na nabijene vrste u plazmi

Tekući se uzorak peristaltičkom pumpom unosi u raspršivač gdje se miješa s argonom u fini aerosol. Uzorak se desolvatira u zoni predgrijavanja plazme (oko 8000 K)¹ te lišen molekula otapala postoji u čvrstom stanju. Daljnjim ulaskom u plazmu redom prelazi u plinovito stanje, disocira na atome (atomizacija) te sudarima s brzim elektronima u plazmi nastaju kationi.



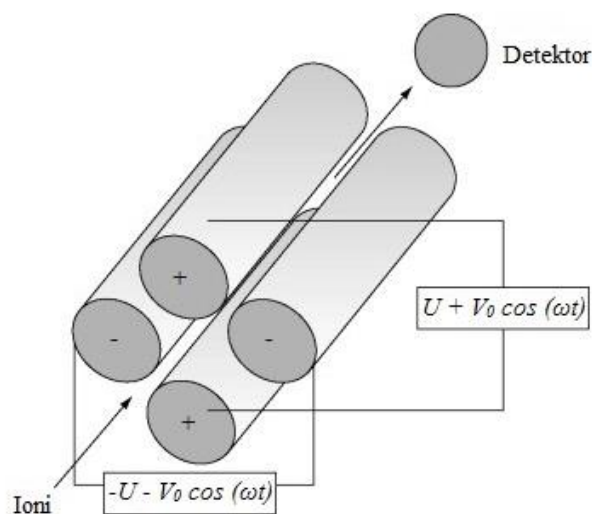
Slika 3. Shema instrumenta ICP-MS

U instrumentu ICP-MS (Slika 3)¹, izvor induktivno spregnute plazme, koji radi pod atmosferskim tlakom (približno 760 Torr) postavljen je horizontalno i služi kao atomizator i

izvor iona. Spregnut je sa spektrometrom masa preko spojnice (engl. *interface*) u kojem se nalaze dva konusa, obično izrađena od nikla, s otvorom po sredini. Kroz otvor prvog konusa (promjera 0,8-1,2 mm), čije se pregrijavanje sprječava vodenim hlađenjem, prolazi vrući plin i ulazi u područje u kojem se tlak mehaničkom pumpom održava pri 1-2 Torr. Ulaskom u to područje plin naglo ekspandira, pritom se hladi i prolazi kratki put do drugog konusa užeg otvora (promjera 0,4-0,8 mm) te nastavlja do analizatora mase kroz ionsku optiku. Ionska optika održava se pod tlakom od približno 10^{-3} Torr i sastoji se od niza metalnih pločica i cilindara na različitim električnim potencijalima. Funkcija optičkog sustava je da odijeli katione od ostalih komponenata plazme poput neutralnih vrsta, elektrona i fotona. Najčešće se odjeljivanje vrši tako da se analizator mase postavi izvan osi duž koje prolaze komponente plazme te se elementima optičkog sustava selektivno usmjeruje katione prema analizatoru mase.¹⁻²

U izvedbi instrumenta ICP-MS mogu se koristiti različiti analizatori mase: analizator mjerenja vremena leta iona (engl. *time-of-flight*, TOF), analizator mase s magnetskim sektorom, analizatori mase s kolizijskom komorom te kvadrupolni analizator mase koji se i najčešće koristi. Do 2004. godine ICP-MS sustavi s kvadrupolnim analizatorom mase činili su 95% svih ICP-MS uređaja.¹

Kvadrupolni analizator mase (Slika 4)⁵ nalazi se između ionske optike i detektora, turbomolekularnom pumpom se održava tlak od 10^{-6} Torr u njegovoj unutrašnjosti. Sastoji se od četiri paralelne cilindrične elektrode, dvije nasuprotne leže u ravnini u kojoj se gibaju ioni, a preostale dvije nasuprotne leže u ravnini okomitoj na tu ravninu – elektrode koje leže u istoj ravnini nazivamo parom elektroda. Elektrode u paru su spojene i prema tome su na istom električnom potencijalu. Prvi par elektroda spojen je na (+), a drugi na (-) kraj izvora istosmjernog napona čiji se iznos može podešavati. Uz to, na svaki par elektroda primijenjen je izmjenični napon čija se amplituda i frekvencija mogu ugađati. Izmjenični naponi na različitim parovima elektroda međusobno su u protufazi, tj. fazna razlika im iznosi π radijana.



Slika 4. Kvadrupolni analizator mase

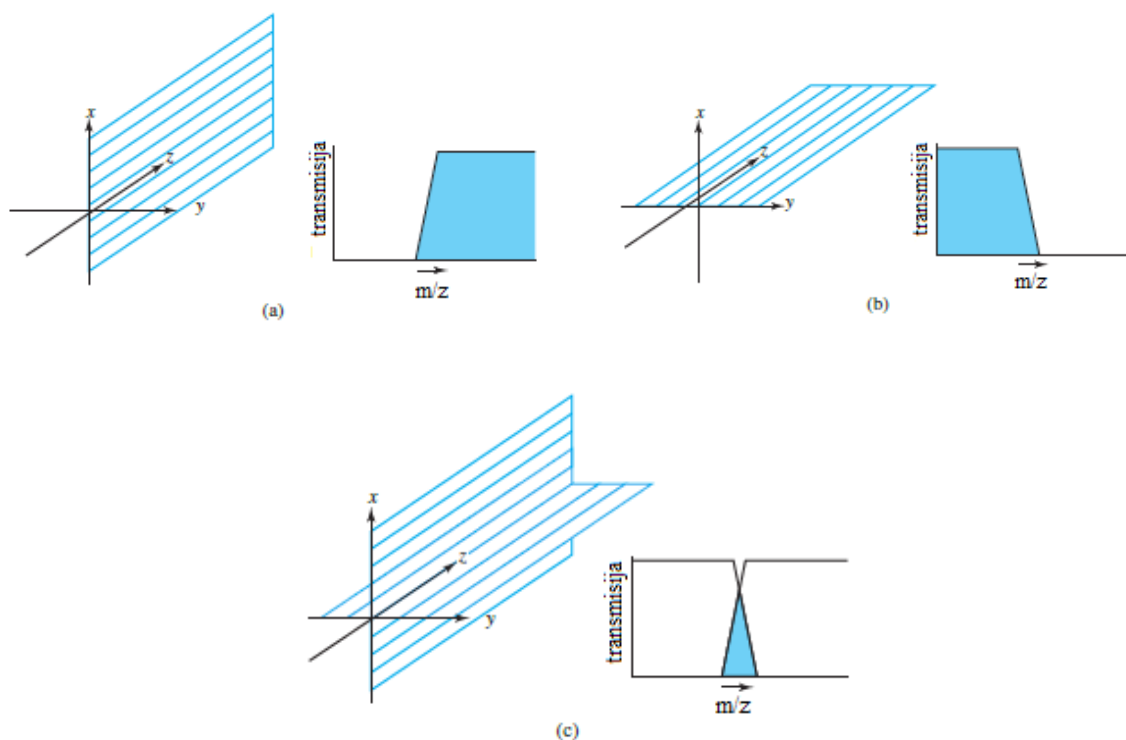
U – istosmjerni napon

V_0 – amplituda izmjeničnog napona

ω – kružna frekvencija izmjeničnog napona

Kvadrupol djeluje kao filter za ione, propušta vrpce iona određenog omjera mase i naboja (m/z). Par elektroda spojen na (+) kraj izvora istosmjernog napona odbija katione, a primijenjeni izmjenični napon tijekom negativnog dijela ciklusa (tj. u periodu kad je $V(t) < 0$) privlači katione. Ako kation ima velik omjer mase i naboja ili je frekvencija izmjeničnog napona visoka, izmjenični napon ne će imati veliki utjecaj na putanju kationa koji će putovati na podjednako udaljenosti od elektroda uz male fluktuacije. Ako kation ima mali omjer mase i naboja ili je frekvencija izmjeničnog napona niska kation se može sudariti s elektrodom tijekom negativnog dijela ciklusa i neutralizirati se. Prema tome, elektrode spojene na pozitivni kraj izvora istosmjernog napona propuštaju do detektora samo katione dovoljno velikog omjera mase i naboja. Par elektroda spojen na negativni kraj izvora istosmjernog napona privlači katione, a primijenjeni izmjenični napon tijekom pozitivnog dijela ciklusa može kation manjeg m/z dovoljno akcelerirati da izbjegne sudar s elektrodom, dok to ne će biti slučaj s kationom većeg m/z zbog prevelike inercije (velika masa iona) ili premale električne sile na ion (mali iznos naboja iona). Elektrode spojene na negativni kraj izvora istosmjernog napona propuštaju do detektora katione dovoljno malog omjera mase i naboja. Rezultat istovremenog djelovanja oba para elektroda koje čine kvadrupol je propuštanje vrpce ione određenog omjera mase i naboja (Slika 5)², a pretraživanje (tj. detekcija kationa različitih m/z vrijednosti) vrši se mijenjanjem

varijabli koje utječu na m/z iona koji mogu proći kroz kvadrupol: iznos istosmjernog napona te amplituda i frekvencija izmjeničnog napona. Kvadrupolni analizator mase može razlučiti ione koje se razlikuju po omjeru mase i naboja za 1 ili više², što je načelno dovoljno dobra rezolucija za potrebe elementne analize.



Slika 5. Električni kvadrupol kao filter masa: a) filtriranje (+) elektroda; b) filtriranje (-) elektroda; c) filtriranje signala putem potpunog električnog kvadrupola

Kationi propušteni kroz analizator mase stižu do detektora. U instrumentima ICP-MS obično se koriste kao detektori elektronski multiplikatori i Faradayevi kolektori, a za određivanje vrlo niskih koncentracija (elementi u tragovima) aktivni film ili diskretni dinodni elektronski multiplikator.¹ Uloga detektora je da propuštenu struju elektrona pretvaraju u električni signal. Primjerice, kanalni elektronski multiplikator je stožastog oblika i na svom vrhu negativnim električnim potencijalom privlači nadolazeće ione. Vezanjem iona na površinu detektor proizvodi puls elektrona (dakle, električni signal) koji se pojačava te računalno obrađuje čime se u konačnici dobiva spektar masa.

U znanstveno-istraživačkom radu Z. Kljaković-Gašpić i suradnici; *Assessment of multiple antropogenic contaminants and their potential genotoxicity in the aquatic environment*

of Plitvice Lakes National Park, Croatia, (referenca 7.), čija se tema izlaže u ovom radu, za kvantitativnu analizu elemenata u uzorcima vode iz Nacionalnog parka Plitvička jezera korištena je metoda ICP-MS.

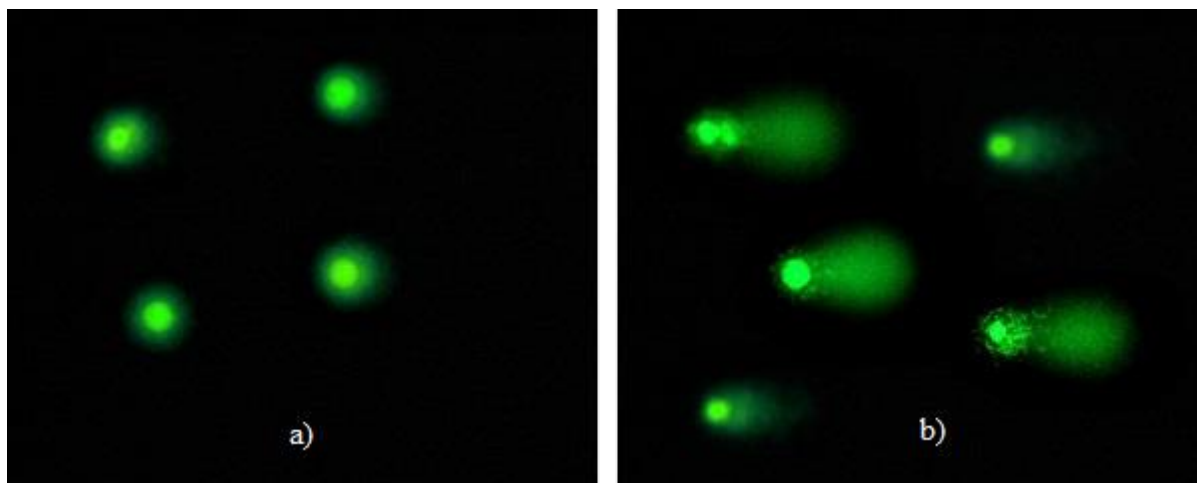
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Uvod u temu istraživanja

Industrijski i ekonomski razvoj u prošlom stoljeću imao je velik utjecaj na okoliš. Čak i nenaseljena područja udaljena od industrijskih zona podložna su antropogenom zagađenju jer se zagađivači iz velikih gradova i industrijskih zona prenose na velike udaljenosti. Krški sustavi, poput Nacionalnog parka Plitvička jezera, naročito su ugroženi zbog brzog prijenosa zagađivača podzemnim vodama. Nacionalni park Plitvička jezera je najstariji (proglašen 8. travnja 1949.) i najveći nacionalni park u Hrvatskoj, smješten je u Gorskoj Hrvatskoj između planinskog lanca Mala Kapela i Ličke Plješivice. Vrijednost NP Plitvička jezera očituje se u kaskadnom sustavu šesnaest jezera odvojenih sedrenim barijerama, prirodnoj ljepoti,⁶ raznolikosti staništa i velikoj bioraznolikosti. Premda ga se često smatra izoliranim od antropogenih utjecaja i primjerom netaknute prirode, NP Plitvička jezera je pod utjecajem lokalnih i globalnih antropogenih aktivnosti doživio određene ekološke promjene.⁷

U razdoblju od 2006. do 2014. godine provedeno je nekoliko istraživanja u svrhu proučavanja razine onečišćenja NP Plitvička jezera poput određivanja makroelemenata i elemenata u tragovima u vodi jezera, alifatskih i policikličkih aromatskih ugljikovodika u sedimentu jezera te teških metala (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn) u tkivu riba.

Tijekom 2011. i 2012. godine provedeno je detaljno istraživanje u sklopu kojeg su kvantitativno određene koncentracije hlapljivih organskih zagađivača (benzen, toluen, etilbenzen, ksileni; engl. krat. BTEX) u vodi, zastupljenih kemijskih elemenata i elemenata u tragovima te antropogenih radionuklida (stroncij-90, cezij-134 i cezij-137). Osim toga, procijenjena je genotoksičnost jezerske i riječne vode gel-elektroforezom pojedinačnih stanica (engl. *single-cell gel electrophoresis*, SCGE) na ljudskim perifernim krvnim limfocitima u zaluženom uzorku vode.



Slika 6. DNA nakon SCGE eksperimenta i bojanja fluorescentnom bojom: a) Neoštećena DNA, b) oštećena DNA iz stanica izloženih genotoksičnoj supstanci poprima oblik kometa

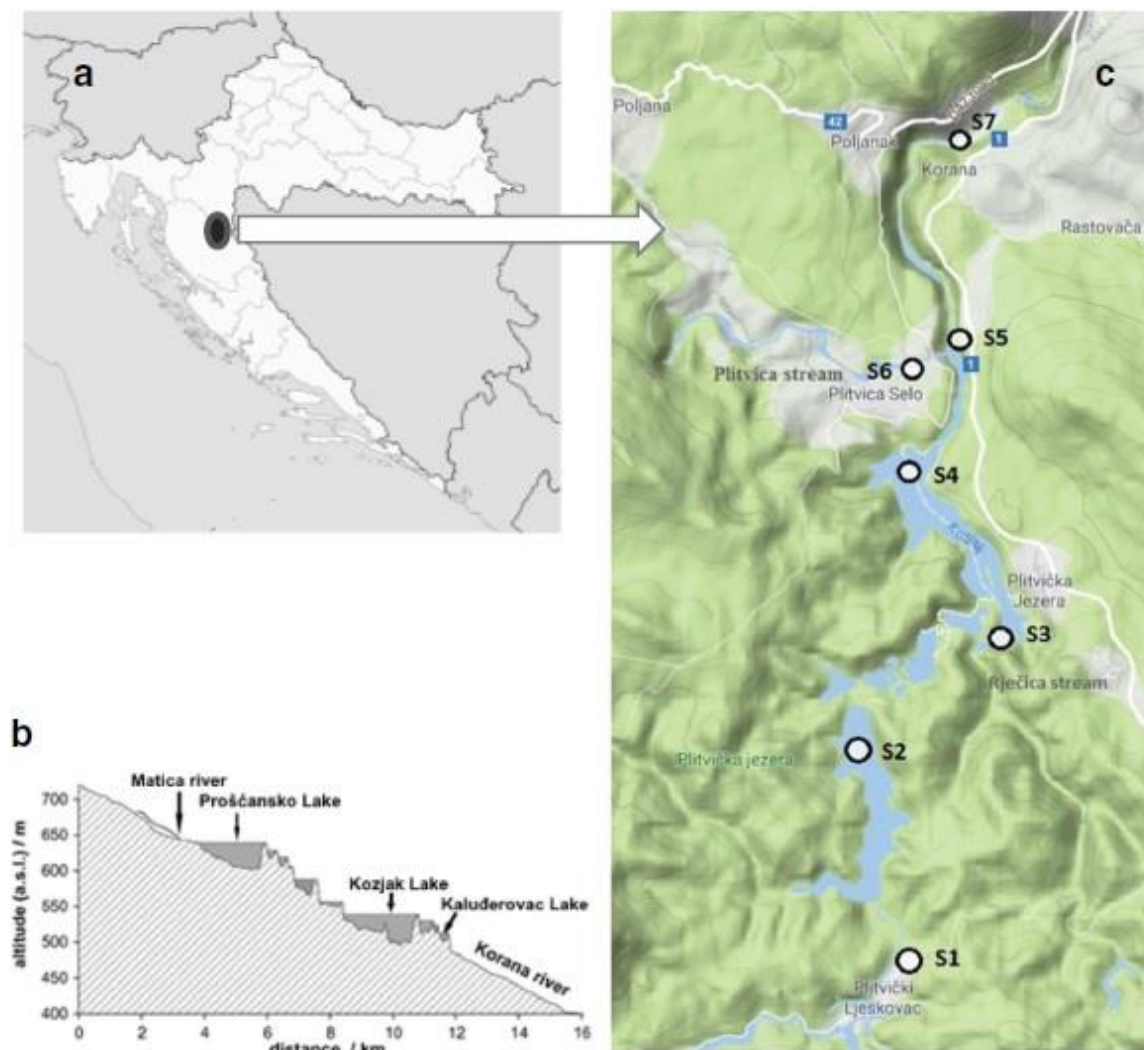
Metoda SCGE je brza i osjetljiva metoda analize i kvantizacije oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama, koju su 1984. godine razvili švedski znanstvenici Östling i Johansson, a dorađena je 1988. te se od tada provodi u bazičnom mediju ($\text{pH} > 13$), čime je postignuta znatno veća osjetljivost.⁹ Stanice izložene supstanci za koju se sumnja da je genotoksična nanose se na tanki sloj agaroznog gela kojim je presvučeno predmetno staklo i ugrađuju u njegove šupljine u kojima su imobilizirane. Lizom stanica (postupak kojim se razgrađuje stanična membrana) dodatkom deterdženta i visoke koncentracije soli uklanjaju se membrane, citoplazma, nukleoplazma te histoni oko kojih je DNA namotana, te zaostaje samo DNA i dijelovi nuklearnog matriksa na koje je vezana.¹⁰ Odmotana DNA podvrgne se elektroforezi na agaroznom gelu pri čemu fragmentirana i oštećena DNA migrira prema pozitivno nabijenoj anodi, a potom se uzorak tretira fluorescentnom bojom specifičnom za DNA čime se, u slučaju da supstanca zaista jest genotoksična, dobije slika koja podsjeća na komete (Slika 6.)⁸ s pripadnom „glavom“ i „repom“ – zbog toga se ova metoda često naziva i kometnim testom. „Glava“ je u tom slučaju načinjena od intaktne DNA, a „rep“ čini oštećena ili fragmentirana DNA koja je raspršena duljinom repa zbog različitih pomaka tijekom elektroforeze u ovisnosti o masi i duljini fragmenata. Za analizu razine oštećenja DNA koristi se fluorescencijska mikroskopija i računalni programi za analizu slike, a utvrđuje se na temelju omjera intenziteta fluorescencije repa i cjelokupnog kometa (što daje postotak DNA koja je migrirala u rep) te dužine repa. Ovisno o pH pri kojem se provodi elektroforeza moguće je detektirati različite

tipove oštećenja DNA poput jednolančanih ili dvolančanih puknuća, mjesta osjetljivih na lužine (kao posljedica oštećenja DNA) te ulančanja DNA s proteinima ili DNA.¹¹⁻¹³

2.2. Materijali i metode

2.2.1. Mjesto istraživanja

NP Plitvička jezera nalazi se na planinskom krškom području sjeverozapadnih Dinarida. Šesnaest kaskadnih jezera povezanih vodopadima nalaze se na nadmorskim visinama od 475 do 636 m. Tradicionalno se dijele na gornja i donja jezera. Predmet proučavanja bila su dva gornja jezera (Kozjak i Prošćansko jezero), jedno donje (Kaludrovac), tri tekućice koje dovode vodu u jezera (Matica, Rječica i Plitvica) te rijeka Korana koja odvodi vodu iz jezera. Matica dovodi vodu u Prošćansko jezero smješteno na najvećoj nadmorskoj visini, Rječica u jezero Kozjak, a Plitvica u jezero Kaludrovac.⁷



Slika 7. a) Položaj NP Plitvička jezera na karti Hrvatske, b) Vertikalni profil mjesta uzorkovanja u nacionalnom parku, c) Lokacije mjesta uzorkovanja na karti NP Plitvička jezera, označena numeriranim oznakama od S1 do S7 koje predstavljaju redom: Maticu, Prošćansko jezero, Rječicu, Kozjak, Kaluđerovac, Plitvicu i Koranu.

Mogući izvori zagađenja parka su prijenos atmosferom, obližnja slabo naseljena područja (ukupno oko 1770 stanovnika), turističke aktivnosti, nepročišćene otpadne vode iz turističkih područja te promet trima državnim cestama (D1, D42 i D52) koje prolaze kroz ili neposredno pored rubova nacionalnog parka. Prometnica D52 koja prolazi kroz područje gdje su bili sakupljeni uzorci naročito ugrožava jezerski ekosustav. Većina turističke infrastrukture smještena je u blizini jezera Kozjak i nije u skladu s današnjim standardima zaštite nacionalnih parkova, kao i zastarjeli kanalizacijski sustav.⁷

2.2.2. Uzimanje uzoraka

Uzorci površinskih voda za analizu fizikalno-kemijskih svojstava vode i određivanje hlapljivih organskih zagađivača te makroelemenata i elemenata u tragovima su uzimani na sedam mjesta diljem parka u periodu od travnja 2011. do travnja 2012. godine s iznimkom veljače 2012. godine zbog vremenskih uvjeta čime je dobiveno dvanaest uzoraka površinskih voda za svako od sedam mjesta uzorkovanja. Također su uzeti dvostruki uzorci vode na dubini od 50 cm (u polietilenske boce) za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava vode i makroelemenata te elemenata u tragovima (osim žive). Uzorci vode za određivanje žive sakupljeni su u staklene boce (Duran glass, Shott, 100 mL). Alikvoti uzoraka za određivanje makroelemenata i elemenata u tragovima zakiseljeni su do $\text{pH} < 2$ ultračistom otopinom dušične kiseline (HNO_3). Alikvoti za analizu hlapljivih organskih zagađivača prelivevani su u boce od jantarnog stakla od 20 mL, pritom napunjene do vrha kako bi se izbjegao kontakt sa zrakom. Svi uzorci namijenjeni za određivanje spojeva BTEX i elementnu analizu bili su pohranjeni u hladnjaku pri temperaturi od 4°C i analizirani unutar dva dana od prikupljanja. Uzorci za analizu radionuklida sakupljeni su jedanput tijekom svakog godišnjeg doba, tj. u travnju, srpnju, rujnu i studenom 2011, na način da je uzeto 25-50 L površinske vode sa svakog od ukupno četiri mjesta uzorkovanja.

2.2.3. Kemijska analiza uzoraka

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka vode (temperatura, pH, električna provodnost, ukupni sadržaj otopljenog ugljika, ukupni sadržaj otopljenog organskog ugljika) izmjerena su tijekom ili odmah nakon postupka prikupljanja uzoraka. pH vode određen je uređajem SevenMulti™ pH- i konduktometrom s InLab® Expert Pro pH elektrodom (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska). Električna provodnost izmjerena je InLab® 731 konduktometrijskom sondom, dok su sadržaji otopljenog anorganskog i organskog ugljika određeni analizatorom ukupnog organskog ugljika (TOC-V_{CPH}, Shimadzu, Nakagyoku, Kyoto, Japan).

Spojevi BTEX u vodi određeni su mikroekstrakcijom vršnih para (iznad vode) na čvrstoj fazi (HS-SPME) i plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (GC-MS). Spojevi *m*- i *p*-ksilen ovom tehnikom nisu se mogli razdvojiti te su za njih zabilježene zajedničke vrijednosti. Preciznost mjerenja, opisana relativnim standardnim odstupanjem, iznosila je 2-11%, a analitički povrat (engl. *recovery*) 91-100%. Granice detekcije procijenjene

su na temelju omjera signala i šuma (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) u iznosu od 3 i kreću se u rasponu od 19 ng L^{-1} (za etilbenzen) do 26 ng L^{-1} (za *m-/p*-ksilen). Svi uzorci za analizu BTEX bili su podijeljeni na dva dijela, tj. za svaki uzorak su napravljena dva mjerenja.

Elementna analiza uzoraka provedena je izravno, bez razrjeđivanja ili filtriranja nakon zakiseljavanja otopinom dušične kiseline, korištenjem spektrometrije mase uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) na uređaju Agilent 7500cx (Agilent technologies, Waldbronn, Njemačka). Kako bi se minimizirale pogreške zbog fluktuacija plazme i mjernog instrumenta, korištena je metoda unutarnjeg standarda – u uzorke je dodana standardna otopina koja sadrži germanij (Ge), rodij (Rh), terbij (Tb), iridij (Ir) i lutecij (Lu). U metodi unutarnjeg standarda konstantna količina otopine unutarnjeg standarda dodaje se u sve uzorke, slijepu probe i baždarnu standardnu otopinu, te se u postupku baždarenja baždarna krivulja dobije nanošenjem omjera signala analita i signala samog unutarnjeg standarda kao funkcije koncentracije analita u baždarnim standardnim otopinama. Metoda je povoljna za kompenzaciju slučajnih pogrešaka koje se pojavljuju kao posljedica instrumentalnih fluktuacija jer ako i analit i unutarnji standard proporcionalno reagiraju na fluktuaciju, omjer njihovih signala ostaje nepromijenjen.²

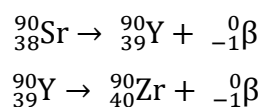
Popis analiziranih elemenata i njihovih granica detekcije u vodi i dan je u Tablici 1.

Tablica 1. Elementi određeni u uzorcima vode i njihove granice detekcije u vodi korištenjem metode ICP-MS.

| Element | Granica detekcije u vodi [$\mu\text{g L}^{-1}$] |
|---------|---|
| Ag | 0,001 |
| Al | 0,06 |
| As | 0,0015 |
| B | 0,1 |
| Ba | 0,05 |
| Be | 0,0002 |
| Bi | 0,0009 |
| Ca | 1,5 |
| Cd | 0,0004 |
| Co | 0,0005 |
| Cr | 0,003 |
| Cs | nije izmjerena |
| Cu | 0,1 |
| Fe | 0,045 |
| Hg | 0,0015 |
| K | 1,9 |
| Li | 0,02 |
| Mg | 0,09 |
| Mn | 0,004 |
| Mo | 0,015 |
| Na | 0,9 |
| Ni | 0,021 |
| Pb | 0,005 |
| Sb | 0,003 |
| Se | 0,0045 |
| Sn | 0,003 |
| Sr | 0,015 |
| Tl | 0,015 |
| U | 0,0014 |
| V | 0,001 |
| Zn | 0,1 |

Granice detekcije izračunate su korištenjem jednadžbe: $\text{LOD} = [X]_{sp} + K \cdot \text{SD}_{sp}$, pri čemu je LOD granica detekcije, $[X]_{sp}$ je prosječna koncentracija elementa X u slijepim probama (načinjeno šest neovisnih mjerenja za svaku slijepu probu), SD_{sp} je standardno odstupanje šest neovisnih mjerenja vrijednosti koncentracija X u slijepim probama, a $K = 3$.⁷

Uzorci za analizu antropogenih radionuklida sakupljeni su i pripremljeni u skladu sa standardnom procedurom propisanom IAEA-om (engl. *International Atomic Energy Agency*). Uzorci vode (25-50 L) za određivanje cezija-134 i cezija-137 upareni su do volumena od 1 L te pohranjeni u Marinellijeve posude za gama spektrometriju. Uzorci za određivanje stroncija-90 upareni su do suha. Aktivnost, koja se definira kao broj radioaktivnih raspada radionuklida u jedinici vremena (mjerna jedinica je bekerel (Bq)), utvrđena je za stroncij-90 nakon radiokemijskog odjeljivanja mjerenjem emisije β^- čestica itrija-90 (pri čemu prelazi u cirkonij-90 koji je stabilan izotop), koji je produkt β^- raspada stroncija 90:¹⁴



Mjerenje aktivnosti itrija-90 provedeno je Geiger-Müllerovim brojačem s ACS (engl. *anti-coincidence shield*) sustavom čija je svrha zaštititi detektor brojača od pozadinskog zračenja koje dolazi izvan područja očitavanja brojača,¹⁵ time smanjujući pozadinski šum instrumenta. Tijekom gama spektrometrije korišten je germanijev koaksijalni fotodetektorski sustav visoke čistoće (HPGe detektor, ORTEC, Sjedinjene Američke Države) s relativnom učinkovitošću od 74,2 % pri 1,33 MeV ⁶⁰Co i razlučivošću od 2,24 keV pri 1,33 MeV ⁶⁰Co.

2.2.4. Ispitivanje genotoksičnosti vode

Uzorci riječne (Plitvica, Matica, Rječica, Korana) i jezerske (Prošćansko jezero, Kozjak i Kaluđerovac) vode prikupljeni u travnju, srpnju i listopadu 2011 te siječnju 2012. upotrebljeni su za ispitivanje potencijalne štetnosti za strukturu i integritet DNA. Prije analize uzeti su alikvoti od 10 mL od svakog uzorka vode i pohranjeni u manju staklenu bočicu na sobnoj temperaturi tijekom pripreme agaroznog gela za komet-test. Kao stanični model korišteni su ljudski krvni limfociti iz uzorka krvi 26-godišnjeg muškog donora, koji je nepušač i ne boluje ni od kakvih kroničnih ili akutnih bolesti, odabranog u skladu s međunarodno prihvaćenim preporukama za provođenje testiranja genotoksičnosti. Uzorak krvi uzet je iz kubitalne vene u *vacutainer* epruvetu obloženu heparinom (Beckton-Vickinson, Ujedinjeno Kraljevstvo), a limfociti su izolirani pomoću Histopaque[®] 1077 reagensa (Sigma Aldrich), te resuspendirani na mediju za kultivaciju stanica (Gibco[®] RPMI 1640 (1X) medij, Life Technologies, Paisley, Ujedinjeno Kraljevstvo) pomoću kapalice. Vijabilnost limfocita provjerena je korištenjem

reagensa tripansko plavo i premašila je 96%.

Tijekom pripreme agaroznog gela korištena su prethodno ohlađena i očišćena predmetna stakla (Surgipath[®], Cambridgeshire, Ujedinjeno Kraljevstvo). Stakalca su prvo presvučena slojem 0,6%-tne agaroze normalnog tališta, a potom je na taj sloj pažljivo pipetom nanoseno 5 μL suspenzije limfocita pomiješane s 0,5%-tnom otopinom agaroze niskog tališta. Za svaki uzorak načinjena su dva istovjetna gela.

Kako bi se stanice izložile uzorcima vode, na priređeni gel s ugrađenim limfocitima otpipetirani su alikvoti od 100 μL uzoraka vode te poklopljeni pokrovnim stakalcem (dimenzija 24 \times 40 mm) i ostavljeni stajati pola sata u vlažnoj komori Heraus Hera 240 staničnog inkubatora (Langelsbold, Njemačka) pri temperaturi od 37°C. Nakon toga su preparati isprani redestiliranom vodom i stavljeni u Coplinove posude – poklopljene posude pravokutnog oblika koje imaju u unutrašnjosti utore za pridržavanje stakalaca za mikroskopiranje – napunjene s pripremljenim puferom za lizu stanica (pH = 10) koji sadrži sljedeće komponente: 2,5 mol L⁻¹ NaCl, 0,100 mol L⁻¹ Na₂EDTA, 0,010 mol L⁻¹ Tris-HCl (tris-(hidroksimetil)aminometanhidroklorid; često se koristi u pripravi puferskih otopina u biokemiji; pK_a = 8,07 pri 25°C),¹⁶ 1% natrijeva laurilsarkozinata (ionski deterdžent), 1% Tritona-X100 (neionski deterdžent) i 10% dimetil-sulfoksida. Nakon sat vremena liziranja, preparati su uklonjeni iz Coplinove posude i podvrgnuti horizontalnoj gel-elektroforezi. Jedinica za elektroforezu napunjena je elektroforetskim puferom visoke pH vrijednosti (0,001 mol L⁻¹ Na₂EDTA, 0,300 mol L⁻¹ NaOH) tako da je razina pufera malo iznad površine preparata. Preparati su stajali u puferu 20 minuta kako bi se omogućilo odmatanje DNA prije elektroforeze, a potom se provodila elektroforeza 20 minuta uz napon od 25 V i struju od 300 mA.¹⁷ Nakon elektroforeze uzorci na gelu su neutralizirani pomoću 0,4-molarnog Tris-HCl pufera (pH = 7,5) te obojeni dodatkom otopine etidijeva bromida masene koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Deset minuta nakon dodatka boje uzorci su analizirani fluorescencijskim mikroskopom (Leitz Orthoplan, Njemačka) uz povećanje 250 \times . Mikroskopska slika snimljena je crno-bijelom kamerom kako bi se prebacila na računalo i analizirala računalnim sustavom za analizu slike. Dobiveno je stotinu kometa po stakalcu korištenjem programa Comet Assay IV[™] (Instem-Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, Halstead, Ujedinjeno Kraljevstvo), a kao varijabla za kvantifikaciju razine oštećenja DNA odabran je intenzitet repa (određen postotkom DNA koja je migrirala u rep).

2.3. Rezultati

2.3.1. Sadržaj spojeva BTEX u vodi

Koncentracija benzena u svim uzorcima vode bila je niža od granice detekcije (LOD, od engl. *limit of detection*) koja iznosi 22 ng L⁻¹, što je daleko niže od maksimalne dozvoljene koncentracije u površinskim vodama (50 mg L⁻¹) propisane standardima Europske Unije. Toluen i *m-/p*-ksilen opaženi su u svim uzorcima, dok je etilbenzen u 53%, a *o*-ksilen u 81%, prikupljenih uzoraka. Dobiveni rezultati dani su u Tablici 2.

Tablica 2. Koncentracije BTEX-spojeva (ng L⁻¹) u uzorcima vode sakupljenim od travnja 2011. do travnja 2012. godine

| mjesto prikupljanja uzoraka | masena koncentracija [ng L ⁻¹] | | | | |
|-----------------------------|--|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | benzen | toluen | etilbenzen | <i>m-/p</i> -ksilen | <i>o</i> -ksilen |
| rijeka Matica | <LOD | 108 ± 16; 110 (70-136) | 47 ± 24; 51 (<LOD-80) | 121 ± 19; 116 (104-167) | 82 ± 43; 87 (<LOD-148) |
| Prošćansko jezero | <LOD | 123 ± 37; 121 (40-189) | 36 ± 32; 11 (<LOD-84) | 150 ± 22; 149 (126-186) | 96 ± 60; 108 (<LOD-177) |
| rijeka Rječica | <LOD | 144 ± 32; 149 (81-184) | 34 ± 29; 11 (<LOD-75) | 165 ± 14; 166 (146-183) | 96 ± 73; 101 (<LOD-183) |
| jezero Kozjak | <LOD | 134 ± 31; 134 (88-207) | 38 ± 25; 39 (<LOD-80) | 162 ± 18; 157 (137-202) | 103 ± 67; 136 (<LOD-174) |
| jezero Kaluđerovac | <LOD | 141 ± 14; 138 (119-167) | 25 ± 21; 11 (<LOD-77) | 157 ± 18; 154 (128-184) | 97 ± 65; 98 (<LOD-181) |
| rijeka Plitvica | <LOD | 155 ± 54; 142 (94-267) | 43 ± 25; 55 (<LOD-75) | 167 ± 32; 161 (131-253) | 99 ± 70; 95 (<LOD-187) |
| rijeka Korana | <LOD | 118 ± 19; 125 (72-138) | 19 ± 19; 11 (<LOD-64) | 139 ± 40; 146 (35-185) | 86 ± 69; 82 (<LOD-177) |

- podaci su izraženi u obliku: prosječna vrijednost ± standardno odstupanje; medijan (raspon)

- <LOD = ispod granice detekcije

- sa svakog mjesta uzeto je dvanaest uzoraka

Koncentracije spojeva BTEX opažene u uzorcima vode u NP Plitvička jezera su niske (od <LOD do 276 ng L⁻¹) i ukazuju na to da je onečišćenje vode ovim spojevima zanemarivo.

2.3.2. Sadržaj mikro- i makroelemenata u vodi

Prosječne koncentracije 30 analiziranih mikro- i makroelemenata dane su u Tablici 3. Razine svih elemenata u vodi su niske, prosječne razine elemenata (posljednji stupac u Tablici 3.) znatno su niže od globalnog prosjeka za koncentracije metala u rijekama za sve elemente osim vanadija, cinka i uranija čije su koncentracije u analiziranoj vodi iznosom bliske globalnom prosjeku. Koncentracije elemenata koji su klasificirani u direktivi Europskog parlamenta i Vijeća Europe iz 2013. godine kao tvari od značaja (Ni, Pb) i opasne tvari od značaja (Cd, Hg)⁷ također su znatno niže od maksimalnih dozvoljenih vrijednosti propisanih tom direktivom: 34 $\mu\text{g L}^{-1}$ za nikal, 14 $\mu\text{g L}^{-1}$ za olovo, 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ za kadmij i 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ za živu, dok su prosječne vrijednosti za navedene metale u ispitanjoj vodi redom: 0,203 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0,018 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0,008 $\mu\text{g L}^{-1}$, a koncentracija žive je bila ispod granice detekcije.

Tablica 3. Prosječne vrijednosti masene koncentracije elemenata i značajnih fizikalnih svojstava uzoraka vode prikupljenih jednom mjesečno od travnja 2011. do travnja 2012.

| parametar | Matica | Proščansko jezero | Rječica | Kozjak | Plitvica | Kaluderovac | Korana | Sva mjesta |
|------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| θ [°C] | 8,2 ± 1,6 | 13,1 ± 1,6 | 8,4 ± 2,4 | 14,8 ± 6,8 | 10,8 ± 4,1 | 14,5 ± 6,6 | 13,8 ± 6,3 | 11,94 ± 5,73 |
| pH | 7,71 ± 0,30 | 7,71 ± 0,39 | 7,75 ± 0,24 | 7,84 ± 0,26 | 7,81 ± 0,31 | 7,93 ± 0,27 | 7,88 ± 0,30 | 7,80 ± 0,30 |
| EC [μS/cm] | 427 ± 14 | 401 ± 26 | 487 ± 26 | 372 ± 19 | 417 ± 29 | 355 ± 24 | 347 ± 29 | 401 ± 52 |
| DTC [mg/L] | 57,2 ± 1,7 | 53,3 ± 2,9 | 68,4 ± 1,8 | 49,8 ± 1,5 | 55,1 ± 2,8 | 47,7 ± 2,2 | 46,0 ± 2,7 | 53,9 ± 7,4 |
| DOC [mg/L] | 0,80 ± 0,56 | 1,05 ± 0,20 | 0,92 ± 0,30 | 0,93 ± 0,17 | 1,14 ± 0,40 | 0,96 ± 0,22 | 1,03 ± 0,39 | 0,98 ± 0,35 |
| DIC [mg/L] | 56,4 ± 2,0 | 52,3 ± 2,9 | 67,5 ± 1,8 | 48,9 ± 1,6 | 53,9 ± 3,0 | 46,8 ± 2,2 | 45,0 ± 2,5 | 53,0 ± 7,4 |
| Na [mg/L] | 0,852 ± 0,131 | 0,816 ± 0,086 | 0,563 ± 0,021 | 0,762 ± 0,043 | 0,535 ± 0,018 | 0,770 ± 0,045 | 0,727 ± 0,056 | 0,718 ± 0,131 |
| Mg [mg/L] | 17,8 ± 2,8 | 19,3 ± 1,4 | 31,0 ± 1,4 | 20,3 ± 0,8 | 19,6 ± 1,6 | 20,5 ± 0,7 | 20,2 ± 0,78 | 21,2 ± 4,4 |
| Ca [mg/L] | 66,1 ± 3,4 | 57,6 ± 4,7 | 61,5 ± 3,2 | 49,0 ± 2,8 | 61,5 ± 3,6 | 45,8 ± 4,4 | 44,2 ± 5,0 | 55,1 ± 8,9 |
| K [mg/L] | 0,300 ± 0,019 | 0,309 ± 0,022 | 0,309 ± 0,022 | 0,305 ± 0,022 | 0,286 ± 0,027 | 0,302 ± 0,028 | 0,302 ± 0,026 | 0,302 ± 0,024 |
| Li [mg/L] | 0,117 ± 0,019 | 0,112 ± 0,013 | 0,103 ± 0,009 | 0,097 ± 0,014 | 0,050 ± 0,009 | 0,101 ± 0,009 | 0,085 ± 0,010 | 0,095 ± 0,024 |
| Al [μg/L] | 4,65 ± 1,94 | 1,29 ± 0,58 | 3,67 ± 1,49 | 0,87 ± 0,26 | 6,39 ± 2,70 | 0,83 ± 0,30 | 1,71 ± 0,68 | 2,77 ± 2,44 |
| As [μg/L] | 0,091 ± 0,007 | 0,102 ± 0,009 | 0,123 ± 0,005 | 0,121 ± 0,011 | 0,099 ± 0,012 | 0,121 ± 0,010 | 0,116 ± 0,016 | 0,110 ± 0,016 |
| B [μg/L] | 2,76 ± 0,14 | 2,85 ± 0,18 | 2,87 ± 0,23 | 3,00 ± 0,48 | 2,80 ± 0,21 | 2,99 ± 0,44 | 2,76 ± 0,25 | 2,86 ± 0,29 |
| Ba [μg/L] | 4,96 ± 0,19 | 4,46 ± 0,14 | 4,00 ± 0,19 | 4,00 ± 0,08 | 3,86 ± 0,17 | 3,82 ± 0,21 | 3,83 ± 0,56 | 4,13 ± 0,48 |
| Be [ng/L] | 1,40 ± 0,31 | 0,70 ± 0,18 | 0,50 ± 0,17 | 0,20 ± 0,05 | 1,00 ± 0,30 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,04 | 0,60 ± 0,47 |
| Cd [ng/L] | 24 ± 3 | 11 ± 7 | 5,6 ± 0,5 | 1,3 ± 0,7 | 8,0 ± 1,4 | 1,0 ± 0,6 | 1,2 ± 0,4 | 8 ± 8 |
| Co [μg/L] | 0,037 ± 0,011 | 0,035 ± 0,011 | 0,036 ± 0,011 | 0,028 ± 0,008 | 0,039 ± 0,010 | 0,026 ± 0,010 | 0,026 ± 0,009 | 0,032 ± 0,011 |
| Cr [μg/L] | 0,169 ± 0,020 | 0,112 ± 0,026 | 0,037 ± 0,015 | 0,059 ± 0,019 | 0,087 ± 0,024 | 0,053 ± 0,022 | 0,056 ± 0,025 | 0,082 ± 0,048 |
| Cu [μg/L] | 0,245 ± 0,135 | 0,216 ± 0,118 | 0,330 ± 0,264 | 0,208 ± 0,143 | 0,240 ± 0,117 | 0,250 ± 0,164 | 0,268 ± 0,210 | 0,251 ± 0,170 |
| Fe [μg/L] | 10,1 ± 2,7 | 11,4 ± 6,7 | 5,53 ± 1,49 | 3,39 ± 1,00 | 9,15 ± 2,49 | 2,24 ± 0,54 | 2,28 ± 0,25 | 6,29 ± 4,61 |
| Mn [μg/L] | 0,581 ± 0,107 | 0,726 ± 0,324 | 0,352 ± 0,092 | 0,288 ± 0,057 | 0,416 ± 0,102 | 0,157 ± 0,050 | 0,125 ± 0,086 | 0,378 ± 0,247 |
| Mo [μg/L] | 0,157 ± 0,028 | 0,236 ± 0,043 | 0,499 ± 0,101 | 0,289 ± 0,057 | 0,178 ± 0,038 | 0,295 ± 0,056 | 0,260 ± 0,050 | 0,273 ± 0,019 |
| Ni [μg/L] | 0,209 ± 0,068 | 0,248 ± 0,059 | 0,218 ± 0,052 | 0,173 ± 0,032 | 0,260 ± 0,038 | 0,158 ± 0,037 | 0,155 ± 0,034 | 0,203 ± 0,060 |
| Pb [μg/L] | 0,026 ± 0,007 | 0,015 ± 0,009 | 0,026 ± 0,008 | 0,019 ± 0,012 | 0,016 ± 0,005 | 0,012 ± 0,010 | 0,009 ± 0,003 | 0,018 ± 0,010 |
| Sb [μg/L] | 0,018 ± 0,003 | 0,021 ± 0,002 | 0,028 ± 0,003 | 0,026 ± 0,002 | 0,028 ± 0,004 | 0,027 ± 0,001 | 0,028 ± 0,003 | 0,025 ± 0,005 |
| Se [μg/L] | 0,059 ± 0,005 | 0,056 ± 0,006 | 0,053 ± 0,005 | 0,047 ± 0,005 | 0,044 ± 0,004 | 0,044 ± 0,007 | 0,040 ± 0,007 | 0,049 ± 0,009 |
| Sr [μg/L] | 58,2 ± 3,6 | 50,4 ± 3,9 | 26,8 ± 1,25 | 42,3 ± 2,3 | 35,0 ± 3,3 | 41,5 ± 2,7 | 39,3 ± 3,0 | 41,9 ± 9,9 |
| Ti [μg/L] | 153 ± 12 | 135 ± 13 | 139 ± 7 | 113 ± 7 | 143 ± 11 | 105 ± 11 | 104 ± 11 | 128 ± 21 |
| U [μg/L] | 0,483 ± 0,078 | 0,534 ± 0,088 | 0,092 ± 0,217 | 0,559 ± 0,063 | 0,375 ± 0,064 | 0,559 ± 0,100 | 0,502 ± 0,089 | 0,572 ± 0,212 |
| V [μg/L] | 0,547 ± 0,047 | 0,561 ± 0,053 | 0,837 ± 0,071 | 0,598 ± 0,057 | 0,548 ± 0,074 | 0,592 ± 0,056 | 0,557 ± 0,044 | 0,605 ± 0,111 |
| Zn [μg/L] | 0,547 ± 0,155 | 0,595 ± 0,306 | 0,614 ± 0,225 | 0,569 ± 0,257 | 0,517 ± 0,326 | 0,570 ± 0,399 | 0,516 ± 0,364 | 0,561 ± 0,292 |

Vrijednosti su zapisane u obliku: srednja vrijednost ± standardno odstupanje

Kratice: EC – električna provodnost (engl. *electrical conductivity*), DTC – ukupni otopljeni ugljik (engl. *dissolved total carbon*), DOC – otopljeni organski ugljik (engl. *dissolved organic carbon*), DIC – otopljeni anorganski ugljik (engl. *dissolved inorganic carbon*)

metode (ICP-MS), baš kao i srebra, bizmuta i kositra. Jedini element čija koncentracija premašuje graničnu vrijednost procjene (engl. *freshwater screening benchmark*) od 4 μg L⁻¹

prema USEPA-i⁷ (engl. *United States Environmental Protection Agency*) je barij čija prosječna vrijednost za sve uzorke iznosi $4,13 \mu\text{g L}^{-1}$.

Iz podataka u Tablici 3. može se uočiti da prosječne koncentracije nekih elemenata znatno variraju ovisno o mjestu uzorkovanja, dok prosječne koncentracije drugih elemenata, poput K, B, Cu, Zn, kao i neka svojstva vode (pH, sadržaj otopljenog organskog ugljika) imaju vrlo slične vrijednosti na svim mjestima.

Korištenjem podataka u Tablici 3. dobije se da su odstupanja od zajedničkog prosjeka za K, B, Cu i Zn na svim mjestima prikupljanja redom: 2,59%, 3,50%, 16,1%, 6,61%. Za elemente čije prosječne koncentracije znatnije variraju od mjesta do mjesta, poput Cd, Fe, Mn i Al, odstupanja od prosjeka iznose redom: 111%, 61,6%, 57,7%, 78,1%, kao što je prikazano u Tablici 4.

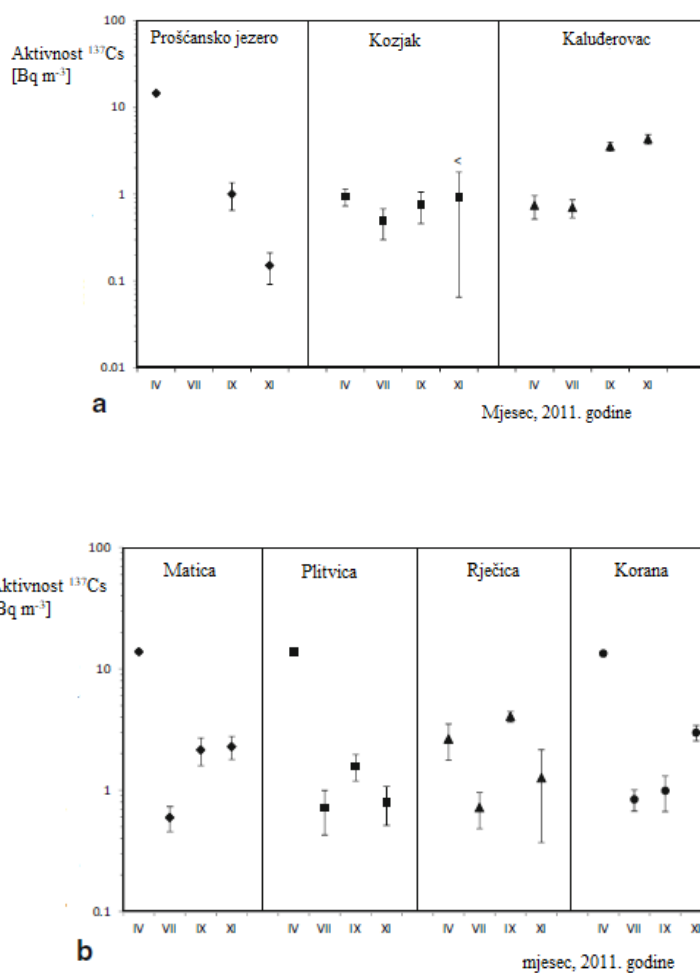
Tablica 4. Varijabilnosti prosječnih koncentracija elemenata ovisno o mjestu uzorkovanja

| mjesto prikupljanja | K [mg/L] | B [$\mu\text{g/L}$] | Cu [$\mu\text{g/L}$] | Zn [$\mu\text{g/L}$] | Cd [ng/L] | Fe [$\mu\text{g/L}$] | Mn [$\mu\text{g/L}$] | Al [$\mu\text{g/L}$] |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Matica | 0,300 | 2,76 | 0,245 | 0,547 | 24 | 10,1 | 0,581 | 4,65 |
| Prošćansko j. | 0,309 | 2,85 | 0,216 | 0,595 | 11 | 11,4 | 0,726 | 1,29 |
| Rječica | 0,309 | 2,87 | 0,330 | 0,614 | 5,6 | 5,53 | 0,352 | 3,67 |
| Kozjak | 0,305 | 3,00 | 0,208 | 0,569 | 1,3 | 3,39 | 0,288 | 0,87 |
| Plitvica | 0,286 | 2,80 | 0,240 | 0,517 | 8,0 | 9,15 | 0,416 | 6,39 |
| Kaluđerovac | 0,302 | 2,99 | 0,250 | 0,570 | 1,0 | 2,24 | 0,157 | 0,83 |
| Korana | 0,302 | 2,76 | 0,268 | 0,516 | 1,2 | 2,28 | 0,125 | 1,71 |
| prosjek | 0,302 | 2,86 | 0,251 | 0,561 | 7,4 | 6,30 | 0,378 | 2,77 |
| SD | 0,00782 | 0,100 | 0,0403 | 0,0371 | 8,3 | 3,88 | 0,218 | 2,17 |
| Odstupanje od prosjeka [%] | 2,59 | 3,50 | 16,1 | 6,61 | 111 | 61,6 | 57,7 | 78,1 |

Koncentracije Ba, Ca, Co, Cd, Cr, Li, Na i Se bile su najviše u rijeci Matici, koncentracije Mg, As, Mo, Pb, U i V te iznosi električne provodnosti i sadržaja otopljenog anorganskog ugljika bili su znatno viši u vodi potoka Rječice nego na svim ostalim mjestima, ali su koncentracije Cr, Sr, Na najniže u Rječici. Koncentracije Al povišene su u svim tekućicama u odnosu na jezera, dok isto vrijedi i za Be, Ca, Cd i Fe s iznimkom Prošćanskog jezera u kojem su razine tih metala povišene u odnosu na ostala jezera. U Prošćanskom jezeru koncentracije Be, Ca, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Se, Sr i Ti znatno su više, a Sb i Mo znatno niže, nego u jezerima Kozjak i Kaluđerovac.

2.3.3. Sadržaj antropogenih radionuklida u vodi

Aktivnost cezija-137 (vrijednosti prikazane na Slici 8.)⁷ mjerena u riječnoj i jezerskoj vodi u travnju 2011. bila je pet do deset puta više od uobičajenih na četiri (Matica, Prošćansko jezero, Rječica i Korana) od sedam mjesta na kojima su uzimani uzorci za analizu radionuklida, što bi mogla biti posljedica nuklearne katastrofe u Fukushima u ožujku 2011. Međutim, premda povišene, ove vrijednosti su znatno niže nego u razdoblju nakon Černobilske katastrofe (travanj 1986.).⁷



Slika 8. Aktivnost cezija-137 u a) jezerskoj, b) riječnoj vodi, tijekom četiri uzorkovanja u 2011. godini. Uspravne crte ukazuju na nesigurnost mjerenja.

Aktivnost cezija-134 u svim uzorcima vode bila je iznad granice detekcije i kretala se u rasponu od 0,2 do 1,66 Bq m⁻³. Vrijeme poluraspada cezija-134 relativno je kratko (približno dvije godine)⁷ pa je vrlo vjerojatno njegova pojava u vodi izravni rezultat nuklearne katastrofe u Fukushimi, budući da se velika većina cezija-134 iz prethodne velike nuklearne katastrofe (1986.) raspala.

Aktivnosti stroncija-90 kretale su se u rasponu od 0,3 do 3,2 Bq m⁻³ za jezersku i 0,3 do 3,5 Bq m⁻³ za riječnu vodu.

Glavni izvori antropogenih radionuklida (¹³⁷Cs, ¹³⁴Cs, ⁹⁰Sr) u prirodi su testiranja nuklearnog oružja, intenzivno provođena 1960-ih godina i nuklearna katastrofa u Černobilu. Stroncij-90 i cezij-137 predstavljaju veliku opasnost za živi svijet zbog relativno dugih vremena poluraspada (28,79 godina za ⁹⁰Sr, 30,17 godina za ¹³⁷Cs)^{14,18} i zbog toga što dijele metabolička svojstva s biogenim elementima kalijem i kalcijem.⁷ Od Černobilske katastrofe 1986. njihova aktivnost u okolišu se smanjivala uslijed radioaktivnog raspada, sve do nove nuklearne katastrofe u Fukushimi u ožujku 2011., koju je pokrenuo jaki potres te potom tsunami. Uslijed katastrofe u biosferu su bili otpušteni radioaktivni produkti fisije te je došlo do globalnog onečišćenja radionuklidima. U 2011. godini koncentracija cezija-134 ponovno je dosegla mjerljive razine što upućuje na nedavno onečišćenje. Međutim, već krajem 2011. razine antropogenih radionuklida pale su na uobičajene vrijednosti.

2.3.4. Genotoksični potencijal vode

Analizom integriteta DNA ljudskih krvnih limfocita u SCGE eksperimentu uz izlaganje uzorcima vode *ex vivo* u trajanju od pola sata utvrđeno je da ispitani uzorci vode u NP Plitvička jezera ne posjeduju jasno izražen genotoksični potencijal. Rezultati eksperimenta dani su u Tablici 5. Unatoč tome, opažene su manje varijacije u genotoksičnom potencijalu uzoraka vode prikupljenih u različitim jezerima. Primjerice, intenzitet repa limfocita nakon izlaganja uzorku vode iz jezera Kaluđerovac dvostruko je veći nego kod limfocita izloženih vodi iz Prošćanskog jezera. Moguće objašnjenje za takav rezultat je položaj tih jezera budući da je Prošćansko jezero smješteno uzvodno, dok je jezero Kaluđerovac bliže nizvodno smještenom hotelu i turističkim objektima.⁷

Tablica 5. Rezultati SCGE eksperimenta i kemijske analize uzoraka vode namijenjenih za procjenu genotoksičnosti.

| | Plitvica | Matica | Prošćansko j. | Rječica | Kozjak | Kaluderovac | Korana |
|---|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| intenzitet repa [% DNA] | 3,27 (1,54 - 6,05) | 2,92 (2,25 - 3,92) | 2,03 (1,06 - 3,37) | 2,89 (1,69 - 3,36) | 2,37 (2,15 - 2,65) | 4,12 (1,55 - 8,61) | 3,17 (1,62 - 3,97) |
| temperatura zraka [°C] | 18,3 (9,5 - 27) | 15,8 (3 - 23) | 14,7 (2,5 - 24) | 12 (-1 - 21) | 12,5 (0,5 - 22) | 15,7 (-2 - 23,5) | 18,4 (8 - 27) |
| temperatura vode [°C] | 11 (4 - 17) | 9 (5 - 10,5) | - | 8,1 (4 - 11) | 14,9 (4 - 23) | 14,7 (3 - 21,5) | 11,7 (4 - 21) |
| pH | 7,94 (7,6 - 8,1) | 7,82 (7,5 - 8) | 7,66 (6,7 - 8,1) | 7,8 (7,5 - 8,0) | 7,92 (7,7 - 8,1) | 8,02 (7,8 - 8,1) | 7,9 (7,6 - 8,2) |
| Električna provodnost [$\mu\text{S cm}^{-1}$] | 410,6 (389 - 434) | 425,4 (417 - 438) | 404,8 (373 - 445) | 496,8 (486 - 527) | 372,8 (349 - 400) | 356,2 (333 - 390) | 366,4 (314 - 420) |
| DOC [mg L ⁻¹] | 1,002 (0,79 - 1,45) | 0,786 (0,49 - 1,92) | 1,126 (0,94 - 1,58) | 0,844 (0,76 - 1,22) | 0,936 (0,83 - 1,04) | 0,954 (0,62 - 1,17) | 0,91 (0,5 - 1,69) |
| DTC [mg L ⁻¹] | 55,38 (52,4 - 58,4) | 57,34 (54,6 - 61,1) | 52,32 (46,3 - 55,2) | 68,52 (66,1 - 71,8) | 49,86 (48,1 - 51,8) | 47,76 (45,5 - 50,4) | 49,24 (42,6 - 61,1) |
| organski zagađivači: | | | | | | | |
| toluen [ng L ⁻¹] | 165,38 (136,4 - 261,5) | 105,96 (96,7 - 113,5) | 130 (103,9 - 189) | 138,54 (92,8 - 182,3) | 137,84 (122,2 - 161,2) | 135,6 (124,7 - 146,5) | 122,04 (112,05 - 130,7) |
| Etilbenzen [ng L ⁻¹] | 62 (57,9 - 66,1) | 53,38 (48,9 - 61,6) | 68,55 (60,7 - 76,4) | 59,27 (51,4 - 65,4) | 46,47 (22,7 - 69,4) | 37,65 (24 - 51,3) | 56,5 |
| <i>o</i> -ksilen | 40,45 (30,6 - 50,3) | 50,37 (37,8 - 61,4) | <LOD | 49,45 (47 - 51,9) | 45,8 (42,3 - 49,3) | 39,33 (23,6 - 48,7) | 22,5 |
| <i>m-/p</i> -ksilen | 160,54 (131,3 - 186,9) | 114,5 (106,6 - 124,3) | 144,92 (128,2 - 176,6) | 147,4 (110,5 - 178) | 155,58 (137,3 - 173,5) | 144,14 (128,3 - 169,4) | 141,72 (115,4 - 176,4) |
| anorganski zagađivači: | | | | | | | |
| Cd [$\mu\text{g L}^{-1}$] | 0,0085 (0,0059 - 0,027) | 0,025 (0,016 - 0,028) | 0,013 (0,015 - 0,026) | 0,0057 (0,005-0,006) | 0,0018 (0,0007 - 0,0027) | 0,0012 (0,0005 - 0,0022) | 0,0013 (0,0008 - 0,0018) |
| Pb [$\mu\text{g L}^{-1}$] | 0,0191 (0,012 - 0,027) | 0,027 (0,016 - 0,041) | 0,0195 (0,006 - 0,037) | 0,032 (0,021 - 0,042) | 0,026 (0,006 - 0,050) | 0,0149 (0,006 - 0,032) | 0,0101 (0,006 - 0,0116) |
| Ni [$\mu\text{g L}^{-1}$] | 0,244 (0,212 - 0,275) | 0,20 (0,135 - 0,292) | 0,252 (0,221 - 0,378) | 0,207 (0,169 - 0,378) | 0,169 (0,15 - 0,216) | 0,158 (0,13 - 0,214) | 0,148 (0,119 - 0,211) |

Vrijednosti izražene u obliku: prosjek (raspon)

Uspoređivanjem rezultata SCGE eksperimenta i kvantitativne kemijske analize vode uočena je korelacija između genotoksičnog potencijala vode i koncentracije kadmija u vodi. Za kadmij je poznato da oštećuje DNA i uzrokuje jednolančana puknuća kao rezultat Cd-DNA interakcija i

utjecaja na djelovanje nukleaza koje cijepaju jedan lanac DNA i/ili DNA-glikozidaza tijekom popravka DNA.⁷

Na temelju rezultata SCGE eksperimenta, razina oštećenja DNA uslijed djelovanja uzoraka vode iz NP Plitvička jezera je unutar prihvatljivih granica, što sugerira da voda iz nacionalnog parka ne sadrži dovoljno visoke koncentracije genotoksičnih spojeva da bi došlo do znatnijeg oštećenja DNA limfocita u primjenjenim eksperimentalnim uvjetima.

2.4. Zaključak

Istražen je sadržaj tri velike skupine antropogenih zagađivača (spojevi BTEX, teški metali [unutar sveobuhvatne elementne analize] i antropogeni radionuklidi) i njihov utjecaj na kvalitetu vode u NP Plitvička jezera kombinacijom kemijskih i citogenetičkih analitičkih tehnika.

Koncentracije BTEX spojeva u vodi nacionalnog parka su vrlo niske što ukazuje na činjenicu da voda nije onečišćena tom vrstom zagađivača. Razine većine makroelemenata i elemenata u tragovima također su niske što sugerira da je većina elemenata prisutnih u vodi prirodnog podrijetla, a ne rezultat antropogenog učinka. Uočene su povišene razine radionuklida ^{137}Cs i ^{134}Cs od travnja 2011. koje su vrlo vjerojatno posljedica nuklearne katastrofe u Fukushimi u ožujku 2011. Do početka 2012. godine radioaktivnost voda u NP Plitvička jezera smanjila se na uobičajenu razinu pozadinskog zračenja i ne predstavlja opasnost po okoliš. Razine oštećenja DNA ljudskih krvnih limfocita određene SCGE eksperimentom nakon izlaganja uzorcima vode kretale su se unutar prihvatljivih granica što znači da voda u NP Plitvička jezera ne posjeduje genotoksični potencijal prema tom tipu stanica.

Rezultati dobiveni unutar ovog i ranijih istraživanja ukazuju na to da postoje određeni antropogeni utjecaji na kvalitetu vode nacionalnog parka, no da su vrlo slabo izraženi i odražavaju zagađenje okoliša na globalnoj razini. Unatoč tome, bilo bi preporučljivo daljnje proučavanje kvalitete vode i općenito antropogenih učinaka na vodeni ekosustav parka, između ostalog kako bi se održalo postojeće stanje i kako bi se na vrijeme uočili negativni trendovi po tom pitanju.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, Marcel Dekker Inc., New York, 2004.
2. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles Of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston MA, 2018, str. 15, 259-260, 263-264.
3. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, Brooks/Cole, Belmont, 2014, str. 778-779.
4. http://www.piescientific.com/Resource_pages/Resource_inductively_coupled_discharge (datum pristupa: 5. veljače 2019.)
5. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/quadrupole-mass-analyzer> (datum pristupa: 25. veljače 2019.)
6. <https://np-plitvicka-jezera.hr/o-parku/opcenito/> (datum pristupa: 8. veljače 2019.)
7. Z. Kljaković Gašpić, S. Herceg Romanić, T. Bituh i suradnici, *Environ. Monit. Assess.*, **190** (2018) 694:1-27.
8. <https://www.abcam.com/comet-assay-kit-3-well-slides-ab238544.html> (datum pristupa: 25. veljače 2019.)
9. R. R. Tice i suradnici, *Environ. Mol. Mutagen.*, **35** (2000) 206-221.
10. A. R. Collins, *Mol. Biotechnol.*, **26** (2004) 249-261.
11. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cancer-research/learning-center/cancer-research-protocols/comet-assay.html> (datum pristupa: 21. veljače 2019.)
12. <http://cometassay.com/> (datum pristupa: 21. veljače 2019.)
13. <https://www.imi.hr/hr/jedinica/jedinica-za-mutagenezu/> (datum pristupa: 21. veljače 2019.)
14. http://www.radioactivity.eu.com/site/pages/Strontium_90.htm (datum pristupa: 21. veljače 2019.)
15. http://www.isdc.unige.ch/integral/download/osa/doc/10.1/osa_um_spi/node15.html (datum pristupa: 21. veljače 2019.)
16. <https://en.wikipedia.org/wiki/Tris> (datum pristupa: 22. veljače 2019.)
17. N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider, *Exp. Cell Res.*, **175** (1988) 184-191.

-
18. <https://www.epa.gov/radiation/radionuclide-basics-cesium-137> (datum pristupa: 22. veljače 2019.)