

Procjena toksičnosti i utjecaja otpadnih voda grada Knina na kakvoću vode rijeke Krke

Brkić, Amalia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:654694>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Amalia Brkić

**Procjena toksičnosti i utjecaja otpadnih voda
grada Knina na kakvoću vode rijeke Krke**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Želimire Cvetković te komentorstvom doc. dr. sc. Mirele Sertić Perić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu. Ovaj rad napravljen je u sklopu projekta „Integrirana procjena odgovora akvatičkih organizama na izloženost metalima: ekspresija gena, bioraspoloživost, toksičnost i biomarkerski odgovori (BIOTOXMET)“.

Veliko hvala mentorici dr. sc. Želimiru Cvetković, komentorici doc. dr. sc. Mireli Sertić Perić i dr. sc. Vlatki Filipović Marijić na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala dr. sc. Tatjani Mijošek, Sari Šariri, Ivani Karamatić i Camille Boucaud na pomoći u laboratorijskom radu.

Zahvaljujem se članovima Laboratorija za biološke učinke metala za prikupljanje terenskih podataka na rijeci Krki.

Hvala dragim prijateljima na divnim zajedničkim trenucima tijekom studija, a najviše Ani, Dini, Albini, Ani, Lani i Lini.

Najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, pomoći i razumijevanju u svakom trenutku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Procjena toksičnosti i utjecaj otpadnih voda grada Knina na kakvoću vode rijeke Krke

Amalia Brkić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Od početka 20. stoljeća, rijeka Krka se iskorištava za vodoopskrbu, proizvodnju električne energije, industriju i poljoprivredu. Svega 2 km uzvodno od Nacionalnog parka Krka, u rijeku Krku se ispuštaju industrijske i komunalne otpadne vode bez prethodnog adekvatnog pročišćavanja. U svrhu procjene utjecaja otpadnih voda na rijeku Krku, uzorkovano je pet lokaliteta gornjeg toka rijeke. Tijekom tri sezone, mjereni su fizikalno-kemijski čimbenici vode te se na uzorcima vode određivala potencijalna toksičnost voda mjerenjem rasta algi vrste *Pseudokirchneriella subcapitata* u kontroliranim uvjetima. Analize su pokazale da je najbolja kvaliteta vode na izvoru rijeke Krke i u pritoci Butišnici. Lošije ekološko stanje s obzirom na pojedine fizikalno-kemijske čimbenike vode je uočeno na lokalitetima uz grad Knin i tvornicu vijaka. Također, u uzorcima vode s ta dva lokaliteta, uočena je i najveća inhibicija rasta algi vrste *P. subcapitata*. Takvi rezultati potvrđuju alge vrste *P. subcapitata* kao osjetljive bioindikatore i ukazuju na onečišćenje vode na pojedinim lokalitetima na rijeci Krki. Kako bi se u budućnosti izbjegle ozbiljne posljedice za ekosustav, potrebno je kontinuirano provoditi monitoring područja.

Ključne riječi: onečišćenje, ekološko stanje, fizikalno-kemijski čimbenici, alga
(46 stranica, 16 slika, 8 tablica, 54 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Želimira Cvetković
Komentor: doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić
izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović
doc. dr. sc. Ivan Čanjevac

Rad prihvaćen: 8. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The assessment of toxicity and impact of Knin wastewaters on the Krka River water quality

Amalia Brkić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Since the beginning of the 20th century, the Krka River has been used for water supply, electricity production, industry, and agriculture. Just 2 km upstream from the Krka National Park, industrial and municipal wastewater is discharged into the Krka River without prior adequate treatment. To estimate influence of the wastewater on the Krka River, water sampling at five sites in the upstream flow of the Krka River was performed. During three seasons, the physico-chemical parameters of the water were measured, and the potential toxicity of the water was determined on the water samples by measuring the growth of algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) under controlled conditions. Analyses have shown that the best water quality is at the Krka River source and in its tributary Butišnica. A poorer ecological status for certain physico-chemical water quality parameters was observed at the sites near the city of Knin and the screw factory. Also, water samples from those two localities, showed the greatest inhibition of algae (*P. subcapitata*) growth. Results confirmed algae (*P. subcapitata*) as sensitive bioindicators and indicated water pollution at some locations along the Krka River. To avoid serious consequences for the ecosystem in the future, it is necessary to continuously monitor the area.

Keywords: pollution, ecological status, physico-chemical parameters, algae
(46 pages, 16 figures, 8 tables, 54 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Želimira Cvetković
Co-mentor: doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Reviewers:

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić, PhD
Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD
Prof. Blanka Cvetko Tešović, PhD
Asst. Prof. Ivan Čanjevac, PhD

Thesis accepted: 8 September 2022

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Rijeka Krka..... | 1 |
| 1.2. Standard kakvoće voda..... | 3 |
| 1.3. Otpadne vode na području Grada Knina | 4 |
| 1.4. Granične vrijednosti emisije otpadnih voda | 6 |
| 1.5. Ekotoksikologija i biotestovi | 7 |
| 2. Cilj istraživanja | 9 |
| 3. Područje istraživanja | 10 |
| 4. Materijali i metode..... | 13 |
| 4.1. Procjena stanja voda analizom fizikalno-kemijskih čimbenika | 13 |
| 4.2. Procjena toksičnosti voda | 13 |
| 4.2.1. Priprema medija za uzgoj algi..... | 14 |
| 4.2.2. Priprema koncentriranog inokuluma algi..... | 15 |
| 4.2.3. Priprema serija razrjeđenja uzoraka vode i serija razrjeđenja referentne tvari | 17 |
| 4.2.4. Inkubacija uzoraka i mjerenje optičke gustoće | 19 |
| 5. Rezultati | 21 |
| 5.1. Fizikalno-kemijski čimbenici | 21 |
| 5.2. Test toksičnosti | 27 |
| 5.2.1. Optička gustoća..... | 27 |
| 5.2.2. LID_A vrijednost | 30 |
| 5.2.3. EC_{50} vrijednosti za referentnu tvar | 31 |
| 6. Rasprava..... | 33 |
| 6.1. Ekološko stanje površinskih voda obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike..... | 33 |
| 6.1.1. Mutnoća vode..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 6.1.2. Temperatura vode | 34 |
| 6.1.3. Ukupno otopljene tvari i električna vodljivost..... | 35 |
| 6.1.4. pH vrijednost..... | 35 |
| 6.1.5. Režim kisika i otopljeni ugljikov dioksid | 36 |
| 6.1.6. Hranjive tvari | 37 |
| 6.2. Toksičnost otpadnih voda obzirom na inhibiciju rasta algi | 39 |
| 7. Zaključak..... | 41 |
| Literatura | 42 |
| Životopis..... | |

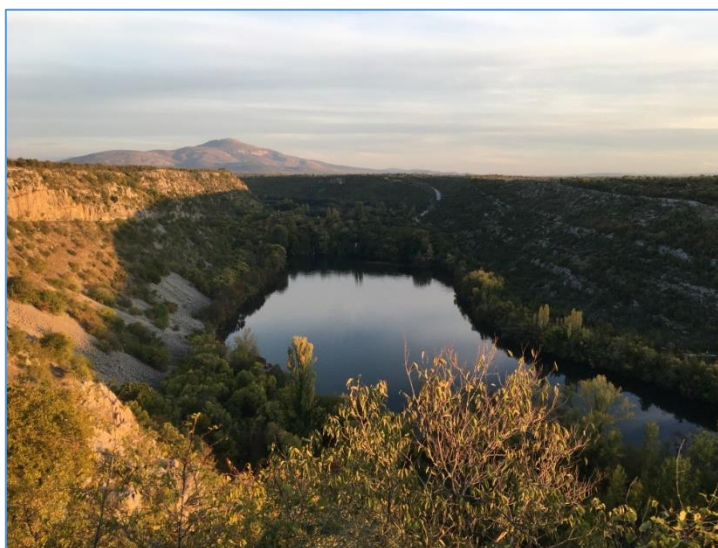
1. Uvod

1.1. Rijeka Krka

Rijeka Krka, duljine 72,5 km, cijelim svojim tokom teče kroz Republiku Hrvatsku i glavni je vodotok Šibensko-kninske županije. Prvih 49 km toka je slatkovodni, a ostatak boćat pod utjecajem Jadranskog mora. Rijeka Krka ima tri stalna izvora – najizdašniji Glavni izvor, Mali izvor i Treći izvor, a u izvor se ulijeva i slap Krčić koji označuje kraj rječice Krčić koja ljeti presušuje (Bonacci 1985; Nacionalni park Krka 2021). Osim Krčića, glavni pritoci Krke su i Kosovčica, Orašnica, Butišnica i Čikola s Vrbom. Pritoci Kosovčica, Orašnica i Butišnica protječu Kninskim poljem, a Čikola s Vrbom protječe Petrovim poljem. Osim navedenih pritoka, rijeka Krka se prihranjuje i podzemnim vodama koje potječu iz Grahova polja i porječja rijeke Zrmanje (Friganović 1961; Nacionalni park Krka 2021; Hrvatske vode 2022). Područje rijeke Krke uzvodno od Nacionalnog parka Krka je 1948. godine zaštićeno kao značajni krajobraz, odnosno to je područje velike krajobrazne i kulturno-povijesne vrijednosti, velike biološke raznolikosti te krajobraz s jedinstvenim obilježjima karakterističnim za pojedino područje. Tu nisu dopušteni zahvati i radnje koje narušavaju obilježja područja, već je ono namijenjeno isključivo odmoru i rekreaciji (NN 70/2005).

Rijeka Krka zajedno sa svojim pritocima čini sustav kompozitnih riječnih dolina u kršu, odnosno kanjon kojeg izgrađuju permske, trijaskne, jurske i kredne naslage te naslage paleogena, neogena i kvartara (**Slika 1.**). Geomorfološki, porječje rijeke Krke dijelimo u tri dijela: planinsko područje na sjeveroistoku obilježeno duboko usječenim dolinama, polja u središnjem dijelu obilježena brojnim izvorima i Sjevernodalmatinska zaravan u koji je usječen najveći dio doline rijeke Krke. Gornji i donji tok rijeke Krke se razlikuju u hidrogeološkim obilježjima. U gornjem, bržem i hladnijem toku dolazi do kontakta vodopropusnih i djelomično vodonepropusnih karbonatnih naslaga na kojem se javljaju mnogi izvori. Također, u gornjem toku rijeka meandrira. Područje nizvodno od Knina izgrađuju vodopropusni vapnenci i djelomično vodonepropusni dolomiti, laporoviti i pločasti vapnenci i vapnenački lapori te je ono siromašnije pritocima od gornjeg toka. Zajedno sa svojim pritocima, nadzemni slijev rijeke Krke zauzima područje oko 2 450 km², dok hidrogeološki slijev ima površinu oko 2 704 km² (Perica i sur. 2005; Lozić i sur. 2014; Nacionalni park Krka 2021).

Rijeku Krku odlikuje velika bioraznolikost. U njoj je zabilježena trideset i jedna vrsta riba od kojih je dvanaest endema te devet vrsta vodozemaca koji su izuzetno osjetljivi na onečišćenje. Područje oko rijeke je i stanište mnogih vodenih kukaca, dvadeset i dvije vrste gmazova te više od dvjesto vrsta ptica i šesnaest porodica sisavaca (Nacionalni park Krka 2022). Prevladavaju bjelogorične, a nešto manje su prisutne crnogorične šume. Posebnost rijeke Krke daju i sedreni slapovi. Sedra je jedno od najprepoznatljivijih obilježja rijeke Krke, a nastaje taloženjem u vodi otopljenog kalcijevog karbonata. Za njen nastanak moraju biti ispunjena tri glavna uvjeta: voda treba biti prezasićena otopljenim kalcijevim karbonatom u obliku kalcijevog bikarbonata ($I_{zas} > 3$), pH vode mora biti iznad 8, a koncentracija otopljene organske tvari mora biti manja od 10 mg L^{-1} . Značajnu ulogu u nastanku sedre imaju i sedotvorne mahovine, alge i biljke. Oni izlučuju mukopolisaharide na koje se lijepo kristalići kalcita, što omogućuje nukleaciju, odnosno rast kristala i nastanak sedre. Na rijeci Krki sedrene barijere grade sedam većih slapišta: Bilušića buk, Ćorića buk, Manojlovac, Rošnjak, Miljacka, Roški slap i Skradinski buk (Lozić i sur. 2014; Nacionalni park Krka 2022).



Slika 1. Rijeka Krka je usjekla korito u karbonatne i klastične stijene (fotografiju izradila: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić).

1.2. Standard kakvoće voda

Uredba o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) dio je Zakona o vodama (NN 66/2019) kojim se propisuje standard kakvoće površinskih voda, voda teritorijalnog mora i podzemnih voda. Uredbom se propisuju elementi za utvrđivanje stanja voda, klasifikacija i standardi kakvoće voda. Stanje voda se određuje na temelju njihova ekološkog i kemijskog stanja. Konačno stanje površinske vode određuje se prema ekološkom ili kemijskom stanju, ovisno o tome koje je lošije. Ekološko stanje voda se ocjenjuje prema biološkim i hidromorfološkim elementima te osnovnim fizikalno-kemijskim čimbenicima, a kemijsko stanje u odnosu na pokazatelje kemijskog stanja, odnosno prema dozvoljenim koncentracijama tvari u vodi. Ovisno o elementima kemijskog stanja, površinske vode mogu biti dobrog kemijskog stanja ili vode u kojima nije postignuto dobro kemijsko stanje. Ovisno o rezultatima ocjene elemenata ekološkog stanja, Uredbom se propisuje pet kategorija stanja:

1. vrlo dobro ekološko stanje
2. dobro ekološko stanje
3. umjereno ekološko stanje
4. loše ekološko stanje
5. vrlo loše ekološko stanje.

Stanje tijela površinske vode na temelju fizikalno-kemijskih čimbenika se ocjenjuje kao vrlo dobro, dobro ili umjereno. Vrlo dobro stanje je kada su sve izmjerene vrijednosti čimbenika manje ili jednake granicama kategorija vrlo dobrog ekološkog stanja (**Tablica 1.**). Dobro stanje je kada se vrijednosti čimbenika nalaze unutar granica za dobro ekološko stanje i da je vrijednost barem jednog čimbenika veća od granica kategorija vrlo dobrog ekološkog stanja (**Tablica 1.**). Najlošije ekološko stanje je umjereno stanje kada je vrijednost najmanje jednog čimbenika veća od granica kategorija za dobro ekološko stanje (**Tablica 1.**).

Stanje vodnog tijela je dobro ako ono ima vrlo dobro ili dobro ekološko stanje i dobro kemijsko stanje. Suprotno, stanje vodnog tijela nije dobro ako vodno tijelo ima umjereno, loše ili vrlo loše ekološko stanje i nije postignuto dobro kemijsko stanje.

Tablica 1. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za fizikalno-kemijske čimbenike prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) za nizinske i prigorske male tekućice (HR-R_11) i za prigorske srednje velike i velike tekućice (HR-R_12). Iz Uredbe su izdvojene samo one granične vrijednosti čimbenika mjerenih u ovom radu.

| oznaka tipa | kategorija ekološkog stanja | granična vrijednost ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske čimbenike - vrijednost 50-tog percentila | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|--|--|-------------------------------------|---|------------------------------------|--|
| | | pH | KPK / Mn (mg O ₂ L ⁻¹) | amonijak (mg N L ⁻¹) | ukupni dušik (mg N L ⁻¹) | nitriti (mg N L ⁻¹) | ukupni fosfor (mg P L ⁻¹) |
| HR-R_11 | vrlo dobro | 7,4 - 8,5 | 2,00 | 0,01 | 0,6 | 0,40 | 0,020 |
| | dobro | 7,0 - 7,4 | 4,00 | 0,05 | 1,0 | 0,70 | 0,060 |
| | | 8,5 - 9,0 | | | | | |
| HR-R_12 | vrlo dobro | 7,4 - 8,5 | 2,00 | 0,01 | 0,6 | 0,40 | 0,020 |
| | dobro | 7,0 - 7,4 | 4,00 | 0,05 | 1,0 | 0,70 | 0,060 |
| | | 8,5 - 9,0 | | | | | |

1.3. Otpadne vode na području Grada Knina

Prema Izvješću o stanju okoliša Šibensko-kninske županije za razdoblje od 2014. do 2017. godine (2019), najveći udio komunalnih i industrijskih otpadnih voda se ispušta u okoliš bez pročišćavanja ili samo po postupku prethodnog pročišćavanja, odnosno, bez prvog, drugog i trećeg stupnja pročišćavanja. Zakon o vodama (NN 66/2019) komunalne vode definira kao „otpadne vode sustava javne odvodnje koje čine sanitarne otpadne vode ili otpadne vode koje su mješavina sanitarnih otpadnih voda s industrijskim otpadnim vodama i/ili oborinskim vodama određene aglomeracije“. Industrijske vode su definirane kao „sve otpadne vode, osim sanitarnih otpadnih voda i oborinskih voda, koje se ispuštaju iz prostora korištenih za obavljanje trgovine ili industrijske djelatnosti“ (NN 66/2019). Ispuštanjem nedostatno pročišćenih otpadnih voda, u ekosustav ulaze razni onečišćivači, odnosno tvari koje potencijalno mogu biti štetne za organizme (npr. pesticidi, lijekovi, proizvodi za čišćenje i kozmetički proizvodi, teški metali).

Ispuštanje industrijskih otpadnih voda u rijeku Krku ima utjecaj na kakvoću vode same rijeke. Na udaljenosti od otprilike 120 m od rijeke Orašnice je smještena tvornica vijaka DIV d.o.o., jedna od najvećih proizvođača vijaka u Europi. Prije nje je na tom području u razdoblju od 1955. do 2005. godine poslovala tvornica vijaka TVIK. Za vrijeme njenog poslovanja, tijekom Domovinskog rata, uništen je spremnik mazuta koji je istekao u lagune što je uzrokovalo

onečišćenje tla i podzemne vode. Industrijske vode koje nastaju u tvornici tijekom proizvodnje se odvođe u unutarnje i vanjske bazene za pročišćavanje te se iz njih voda ispušta u lagune. Lagune su smještene uz sam tok rijeke Orašnice, neposredno prije njenog utoka u rijeku Krku (DLS d.o.o. 2018a; DLS d.o.o. 2018b). Međutim, u bazenima ne dolazi do odgovarajućeg pročišćavanja te onečišćena voda završava u lagunama. U mulju i vodi laguna je identificirano nekoliko onečišćivača: mazut, strojna ulja, isparljivi organski ugljikovodici, krom, aluminijski, fosfor, cink, kloridi i smjesa benzena, toluena i ksilena poznata pod nazivom BTX. U nekoliko navrata, rezultati praćenja emisija onečišćujućih tvari su pokazali da pojedini pokazatelji prelaze granične vrijednosti (DLS d.o.o. 2018b; Filipović Marijić i sur. 2018; Kisić i sur. 2019). Također, događalo se da se tijekom visokih vodostaja, industrijska voda s mazutom i teškim metalima prelila iz laguna u rijeku Orašnicu, a zatim i u rijeku Krku, ulazeći i u područje Nacionalnog parka. Kako bi se to spriječilo, podignut je nasip između rijeke Orašnice i laguna. Međutim, to nije riješilo moguće protjecanje otpadne vode u podzemne vodotoke (Filipović Marijić i sur. 2018; Hina 2019; Kisić i sur. 2019). Tvornica je nabavila pročištač industrijskih voda kako bi ispunila uvjete Pravilnika o graničnim vrijednostima industrijskih voda o ispuštanju tih voda u javnu odvodnju. Prema Pravilniku industrijske vode iz bazena se mogu ispustiti u javnu odvodnju nakon što se pročiste na razinu komunalnih voda. Nakon pročišćavanja, vode iz bazena bi odlazile kroz do gradskog pročištača, međutim, gradski pročištač još nije u potpunosti funkcionalan (NN 26/2020; Blažević 2020). Onečišćene lagune su prema Odluci o donošenju Plana gospodarenja otpadom Republike Hrvatske za razdoblje 2017. do 2020. (NN 3/2017), klasificirane kao „crna točka“, odnosno lokacija onečišćena otpadom, koju je potrebno sanirati. U tom razdoblju je izrađen prijedlog Plana sanacije, a 2021. godine Hrvatske vode su izradile Sanacijski program s prijedlogom mjera za otklanjanje štete u okolišu (Službeno glasilo 2021; Upravni odjel za zaštitu okoliša i komunalne poslove 2021).

Otpadne vode grada Knina ispuštaju se u rijeku Krku, Marčinkovac i Orašnicu te u akumulacijsko jezero Golubić, koje je dio vodotoka rijeke Butišnice (OIKON 2019). Otpadne vode grada Knina imaju direktan utjecaj na rijeku Krku jer se one ispuštaju izravno u nju bez pravilnog pročišćavanja. Premda, postoji pročištač s dva kolektora, od kojih je, do nedavno, samo jedan bio u funkciji jer je drugi postavljen u močvarnom tlu te je tonuo. Taj drugi kolektor je saniran, ali još uvijek dio nepročišćenih komunalnih voda završava u laguni (Službeno glasilo 2021). Analizom vode i mulja 2019. godine, kod ispusta komunalnih voda grada Knina, u vodi nisu utvrđene prekomjerne koncentracije onečišćivača, ali su u mulju utvrđene povećane koncentracije aluminijska

i kalcija (Kisić i sur. 2019). Ispusti otpadne komunalne vode grada Knina u rijeci Krki udaljeni su svega 2 km od granice Nacionalnog parka Krka (Filipović Marijić i sur. 2018; Blažević 2022). Kako je to krško područje, sva nedostatno pročišćena otpadna voda može ući u podzemne tokove i zagaditi izvore pitke vode (Perica i sur. 2005).

1.4. Granične vrijednosti emisije otpadnih voda

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020) dio je Zakona o vodama (NN 66/2019) kojim se propisuju dopuštene koncentracije onečišćujućih tvari u otpadnim vodama prije njihovog ispuštanja u površinske vode (**Tablica 2.**). U istom se za ekotoksikološke pokazatelje navode granične vrijednosti za vodenbuhu (*Daphnia magna* Straus, 1820) i za svjetleće bakterije (Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Vibrionales, Vibrionaceae, vrsta *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) Lehmann & Neumann, 1896). Komunalne vode moraju proći drugi stupanj pročišćavanja, odnosno biološko pročišćavanje prije ispuštanja u površinske vode. Za industrijske vode propisane su granične vrijednosti i način pročišćavanja ovisno o tipu industrije (NN 26/2020).

Tablica 2. Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, za površinske vode (NN 26/2020). Iz Pravilnika su izdvojene samo one granične vrijednosti mjerenih fizikalno-kemijskih čimbenika i tvari u ovom radu.

| <i>pokazatelj</i> | <i>granične vrijednosti</i> |
|---|-----------------------------|
| temperatura vode (°C) | 30,0 |
| pH | 6,5 - 9,0 |
| KPK / Mn (mg O ₂ L ⁻¹) | 125,00 |
| amonijak (mg N L ⁻¹) | 10,00 |
| ukupni dušik (mg N L ⁻¹) | 15,0 |
| nitriti (mg N L ⁻¹) | 2,00 |
| nitriti (mg N L ⁻¹) | 1,000 |
| ukupni fosfor (mg P L ⁻¹) | 2,000 |

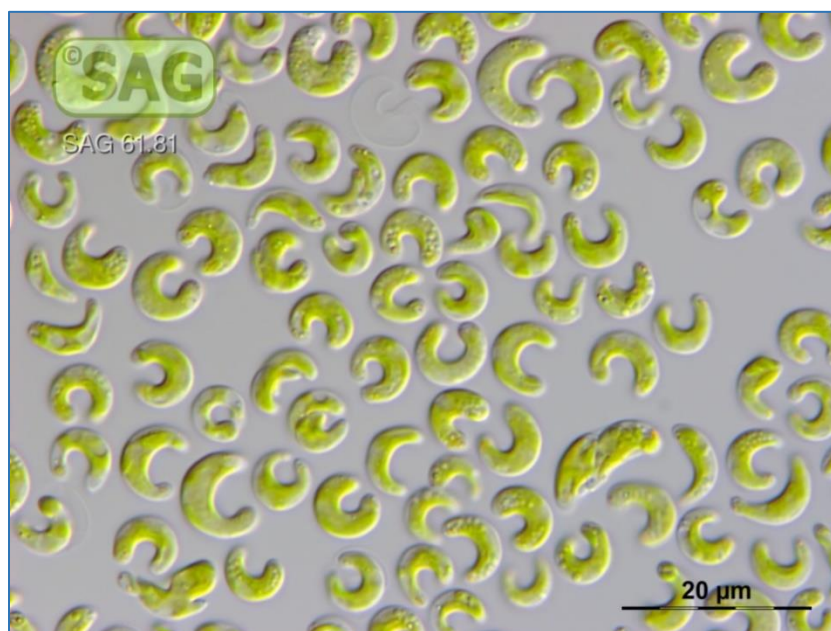
1.5. Ekotoksikologija i biotestovi

Termin ekotoksikologija je prvi puta upotrijebio René Truhaut 1969. godine. Prema njemu, ekotoksikologija je grana toksikologije koja se bavi proučavanjem učinka onečišćivača prirodnog i antropogenog porijekla na zajednice ekosustava. To je multidisciplinarna znanost koja objedinjuje ekologiju, toksikologiju, kemiju, epidemiologiju i farmakologiju s ciljevima prikupljanja dovoljne količine podataka za procjenu okolišnog rizika i upravljanja okolišem, zadovoljenje zakonskih uvjeta za razvoj novih kemijskih spojeva i određivanje dozvoljenih koncentracija u okolišu te za razvoj empirijskih ili teorijskih principa za poboljšanje znanja o ponašanju i učinku kemikalija u ekosustavima (Connell i sur. 2009).

Toksičnost je svojstvo tvari da izazove štetni učinak u organizmu. Štetni učinak je mjerljiv te može biti letalan kada dolazi do smrti organizma ili subletalni koji uključuje promjene u razvoju, ponašanju, fiziološke i biokemijske promjene. Koliko će određena tvar biti toksična ovisi o njenoj koncentraciji i vremenu izloženosti organizma toj tvari te o biotičkim i abiotičkim čimbenicima. Kako bi se odredila mjera, odnosno koncentracija, u kojoj određena tvar postaje toksična, testni organizmi se izlažu progresivno većim koncentracijama potencijalno toksične tvari ili seriji razrjeđenja uzoraka iz okoliša (npr. uzorci vode). Najveću koncentraciju tvari koja ne uzrokuje promjene nazivamo razina neučinkovitosti (NOEL). Koncentraciju tvari koja uzrokuje određeni učinak u 50 % populacije nazivamo srednja učinkovita koncentracija (EC₅₀), dok koncentraciju tvari koja uzrokuje 50 %-tnu smrtnost populacije nazivamo srednje letalna koncentracija (LC₅₀). Potencijalno toksičan učinak tvari na organizme određuje se primjenom testova toksičnosti, odnosno biotestovima. Biotestovi se provode u kontroliranim uvjetima, što omogućuje ekstrapolaciju rezultata na uvjete u okolišu. Kao testni organizmi, često se koriste mikroorganizmi poput bakterija, algi i praživotinja kod kojih se prati prirast i koncentracija sintetiziranih proteina. Biotestove s mikroorganizmima karakteriziraju cjenovno pristupne, jednostavne, brze i učinkovite metode koje zamjenjuju skupa, dugotrajna i složena testiranja na životinjama poput štakora (Knight 2008; Viegas 2021).

Alge su jedna od najvažnijih komponenti vodenih ekosustava. One proizvode kisik i organske tvari poput polisaharida i proteina koje su nužne za život viših organizama (Ma i sur. 2006). Zelena alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F. Hindák, 1990 (stari nazivi: *Selenastrum capricornutum* Printz 1914 i *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Nygaard, 1987) je jednostanična slatkovodna alga skupine Chlorophyta (**Slika 2.**). Pripada redu Sphaeropleales

unutar razreda Chlorophyceae (Suzuki i sur. 2018). Osim što je važna u ekosustavu kao primarni proizvođač, ova se alga pokazala kao osjetljiv indikator za određivanje toksičnosti u slučaju ispuštanja otpadnih voda u površinske kopnene vode. Visoko je osjetljiva na prisutnost teških metala i organskih onečišćivača poput pesticida. Iz tih razloga, *P. subcapitata* je jedna od najčešće korištenih algi unutar komercijalnih biotestova kojima se mjeri inhibicija njenog rasta unutar 72 h od početka izloženosti ispitivanoj tvari (Tousova i sur. 2018; Viegas 2021). Za sada, u zakonskoj regulativi Republike Hrvatske nema propisanih graničnih vrijednosti određenih prema razini toksičnosti za alge (NN 26/2020).



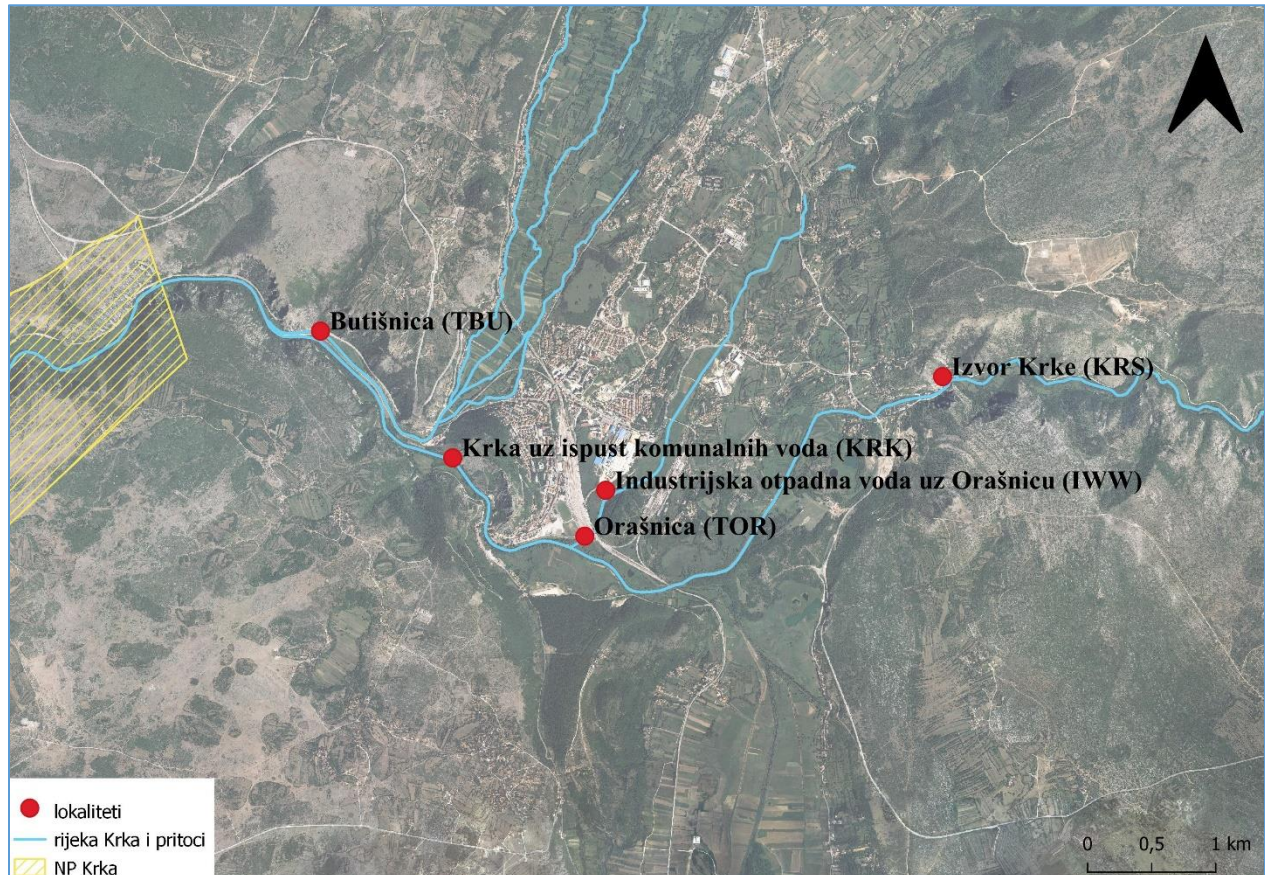
Slika 2. Jednostanična, zelena slatkovodna alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (izvor slike: SAG 2022).

2. Cilj istraživanja

Glavni je cilj ovog istraživanja odrediti utjecaj otpadnih voda grada Knina, odnosno komunalnih i industrijskih otpadnih voda grada Knina na kakvoću vode rijeke Krke. To će se postići određivanjem potencijalne toksičnosti industrijskih i otpadnih voda grada Knina metodom mjerenja rasta algi u kontroliranim uvjetima u vodi prikupljenoj na pet lokaliteta u porječju rijeke Krke, odnosno praćenjem fizikalno-kemijskih čimbenika prikupljene vode tijekom tri sezone mjerenja (proljeće, ljeto, jesen). Odabrani lokaliteti uključuju izvor rijeke Krke, gdje se očekuje najbolja kakvoća s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike kakvoće vode, te četiri lokaliteta nizvodno od izvora koji su pod direktnim utjecajem neprikladno obrađenih otpadnih voda gdje se očekuje slabija kakvoća vode s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike kakvoće vode zbog utjecaja onečišćujućih tvari u ekosustav. Rezultati istraživanja će pokazati pročišćuju li se otpadne vode dostatno prije ispuštanja u okoliš i predstavljaju li potencijalnu opasnost za ekosustav rijeke Krke. Uz to, procjenom toksičnosti voda primjenom zelene alge *P. subcapitata*, cilj je potvrditi kako su alge osjetljivi bioindikator.

3. Područje istraživanja

Terensko istraživanje je provedeno 2021. godine na pet lokaliteta duž toka rijeke Krke, uzvodno od NP Krka. Odabrani lokaliteti uključuju dio toka rijeke Krke koji je pod antropogenim utjecajem otpadnih industrijskih voda tvornice vijaka i otpadnih komunalnih voda grada Knina te lokalitete na kojima se ne očekuju antropogeni utjecaji. Uzorci vode su prikupljeni na izvoru rijeke Krke (referentna postaja) (KRS) (Slike 3. i 4A.), na pritoci Orašnici prije njenog ulijevanja u Krku (TOR) (Slike 3. i 4B.), dijelu Krke uz ispušt komunalnih otpadnih voda grada Knina (KRK) (Slike 3. i 4C.), pritoci Butišnici koja je pod utjecajem poljoprivredne aktivnosti (TBU) (Slike 3. i 4D.) te na lagunama s industrijskom otpadnom vodom uz pritoku Orašnicu (IWW) (Slike 3. i 4E.).



Slika 3. Područje istraživanja (podloga Geoportal).



Slika 4. Lokaliteti na kojima se provodi istraživanje. A) izvor rijeke Krke (referentna postaja) (KRS). B) Rijeka Orašnica (TOR). C) Krka uz ispust komunalnih voda (KRK). D) Rijeka Butišnica (TBU). E) Industrijska otpadna voda uz Orašnicu (IWW) (fotografije izradila: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić).

U Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) dan je popis naziva i oznaka tipa rijeka. Prema tom popisu i Izvratku registra vodnih tijela (Hrvatske vode 2021), lokaliteti KRS, KRK i TBU nalaze se u dijelu Krke koji se klasificiraju kao prigrorske srednje velike i velike tekućice (HR-R_12), dok se lokalitet TOR nalazi na dijelu koji se klasificira kao nizinske i prigrorske male tekućice (HR-R_11). Sve vode pripadaju Dinaridsko primorskoj subregiji. Lokalitet IWW klasificira se kao otpadna voda prema Zakonu o vodama (NN 66/2019) (**Tablica 3.**).

Tablica 3. Tipovi površinskih voda odabranih lokaliteta prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) i Izvatku registra vodnih tijela (Hrvatske vode 2021).

| <i>lokalitet</i> | <i>naziv tipa</i> | <i>oznaka tipa</i> |
|---------------------------------|--|--------------------|
| izvor rijeke Krke (KRS) | prigorske srednje velike i velike tekućice | HR-R_12 |
| pritoka Orašnica (TOR) | nizinske i prigorske male tekućice | HR-R_11 |
| Krka kod Knina (KRK) | prigorske srednje velike i velike tekućice | HR-R_12 |
| pritoka Butišnica (TBU) | prigorske srednje velike i velike tekućice | HR-R_12 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | otpadna voda | |

4. Materijali i metode

4.1. Procjena stanja voda analizom fizikalno-kemijskih čimbenika

Uzorci vode sakupljeni su u tri sezone – proljeće (travanj), ljeto (srpanj) i jesen (listopad) 2021. godine na lokacijama prikazanim na **slici 3**. Terenskim mjeracima (Mettler Toledo, SAD) su *in situ* na pet lokaliteta izmjereni pH, temperatura, električna vodljivost, zamućenost, ukupno otopljene krute tvari, koncentracija i zasićenje kisikom. Na svakoj je postaji uzeta i dodatna litra vode za daljnje laboratorijske analize određivanja kemijske potrošnje kisika, koncentracije amonijaka, ukupnog dušika, ukupnog fosfora te nitrata i nitrita. Dobivene vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika i hranjivih tvari sam usporedila s graničnim vrijednostima propisanim Uredbom o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) za lokalitete KRS, TOR, KRK i TBU (**Tablica 1.**) i Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, za površinske vode (NN 26/2020) za lokalitet IWW (**Tablica 2.**).

4.2. Procjena toksičnosti voda

Dio prikupljene vode na terenu sam koristila za procjenu toksičnosti primjenom protokola Algaltokit FTM (1996) i norme ISO 8692 (2012). Algaltokit FTM komplet sadrži kuglice (eng. *beads*) imobilizirane zelene alge *P. subcapitata*. Kuglice su promjera oko 2 mm, a svaka kuglica sadrži oko milijun stanica algi. Osim algi, u kompletu se nalaze četiri različite otopine hranjivih tvari, otopina za deimobilizaciju algi, 36 plastičnih kiveta s poklopcima za uzorke, dvije kivete za kalibraciju spektrofotometra i mjerenje apsorbancije suspenzije algi, protokol, tablice za unos izmjerenih vrijednosti optičke gustoće te graf ovisnosti optičke gustoće o broju stanica algi (**Slika 5.**). Testove toksičnosti su provedeni u razdobljima: 4.–7. svibnja, 27.–30. srpnja i 23.–26. studenoga 2021. godine.



Slika 5. Sadržaj Algaltoxit FTM kompleta (fotografiju izradila: dr. sc. Želimira Cvetković).

Primijenjeni test toksičnosti sastoji se od pet glavnih koraka:

1. pripremanje medija za uzgoj algi
2. priprema koncentriranog inokuluma algi
3. priprema serija razrjeđenja uzoraka vode i serija razrjeđenja referentne tvari
4. inkubacija uz kontinuirano osvjetljenje
5. mjerenje optičke gustoće na 670 nm pomoću spektrofotometra.

4.2.1. Priprema medija za uzgoj algi

Medij za uzgoj algi sam pripremila u odmjerne tikvici od 2 L u kojoj sam pomiješala destiliranu vodu s 20 mL koncentrirane otopine hranjivih tvari „Nutrient Stock A“ te s po 2 mL svake preostale otopine hranjivih tvari („Nutrient Stock B, C i D“). Pripremljeni medij sam pretila u bocu te bocu snažno protresla kako bi se sadržaj dobro aerirao i homogenizirao. Pomoću pH metra sam provjerila da je pH medija unutar raspona 7,9 – 8,3.

4.2.2. Priprema koncentriranog inokuluma algi

Iz tubica koje sadrže imobilizirane alge izlila sam matiks za imobilizaciju i dodala 5 mL „Matrix dissolving“ medija, odnosno otopinu koja će ukloniti sav medij koji imobilizira alge. Tubice sam vorteksirala sve dok se kuglice algi nisu potpuno razbile. Dobivenu homogenu suspenziju prebacila sam u epruvete za centrifugiranje. Za centrifugiranje sam koristila uređaj Sorvall RC28S s hlađenjem (Kendro, SAD). Smjesu sam centrifugirala 10 minuta na 3000 rpm (okretaja po minuti) na sobnoj temperaturi, nakon čega sam izlila supernatant i ulila 10 mL deionizirane vode te ponovila vorteksiranje i centrifugiranje (**Slika 6.**). Nakon centrifugiranja, u tubice s talogom sam dodala 10 mL medija i smjesu prebacila u odmjerne tikvice od 25 mL. Tikvicu sam dopunila medijem i protresanjem homogenizirali smjesu.

Optičku gustoću sam mjerila pomoću UV/VIS spektrofotometra DR6000 (Hach, SAD). Kivetu za slijepu probu sam napunila s 25 mL medija za uzgoj te sam njome kalibrirala spektrofotometar mjerenjem apsorbancije na 670 nm. Spektrofotometar sam kalibrirala na početku svakog dana mjerenja. U kivetu za prvo mjerenje ulila sam 25 mL suspenzije algi, zatvorila i protresla kivetu te očitala optičku gustoću (OD) suspenzije na 670 nm (**Slika 7.**) Iz grafičkog prikaza koji se nalazi unutar Algaltookit FTM odredila sam broj algi (N1) u kiveti koji odgovara izmjerenoj optičkoj gustoći (OD1). Taj sam broj izračunala koristeći jednadžbu pravca, gdje vrijednost x odgovara izmjerenoj optičkoj gustoći, a vrijednost y broju stanica algi koji odgovara toj optičkoj gustoći. Iz omjera $N1/N2$ ($N2 = 1 \times 10^6$ stanica mL^{-1}) izračunala sam faktor razrjeđenja potreban da se dobije optička gustoća koja odgovara količini od milijun stanica u uzorku (OD2). Nakon što sam odredila faktor razrjeđenja, suspenziju algi sam prelila u odmjernu tikvicu od 100 mL i dodala izračunati volumen medija potreban da napravim suspenziju, odnosno inokulum, koncentracije 1×10^6 stanica mL^{-1} .



Slika 6. Deimmobilizacija algi. Kako bi se dobila čista suspenzija algi, potrebno je ukloniti sav medij za imobilizaciju: A) uklanjanje medija koji imobilizira alge, B) vorteksiranje, C) centrifugiranje homogene suspenzije, D) talog (suspenzija algi) dobiven nakon izlivanja supernatanta (fotografije izradila: dr. sc. Želimira Cvetković).



Slika 7. Kiveta s čistim medijem za uzgoj algi (slijepa proba) za kalibriranje spektrofotometra i kiveta suspenzije algi za prvo mjerenje apsorbancije i određivanje faktora razrjeđenja (fotografiju izradila: Amalia Brkić).

4.2.3. Priprema serija razrjeđenja uzoraka vode i serija razrjeđenja referentne tvari

Prikupljene uzorke vode sam filtrirala, homogenizirala i napravila serije razrjeđenja prema **tablici 4**. Za uzorke KRS i TBU nisam radila seriju razrjeđenja, već ih samo prelila u odmjerne tikvice te dodala 1 mL otopine hranjivih tvari A i 0,5 mL otopina hranjivih tvari B, C i D. Seriju razrjeđenja sam napravila za sve ostale uzorke vode (IWW, TOR i KRK). U tikvici označenoj s *IWW100* sam pomiješala 100 mL uzorka vode IWW s 1 mL otopine hranjivih tvari A i s po 0,5 mL otopina hranjivih tvari B, C i D kako bi dobila početno razrjeđenje, odnosno uzorak koncentracije 100 %. Ostale četiri tikvice sam označila pripadajućim opisom (*IWW50*, *IWW25*, *IWW12,5*, *IWW6,5*) te sam pripremila razrjeđenja prema **tablici 4**. Zatim sam u svaku tikvicu dodala po 1 mL suspenzije algi koncentracije 1×10^6 . Isti postupak sam ponovila za ostale uzorke vode (TOR i KRK), a za lokalitet IWW sam radila dodatnu seriju razrjeđenja u koju nisam dodala suspenziju algi. Za kontrolu sam u tikvici pomiješala medij i suspenziju algi. Sadržaj tikvica sam prelila u kivete. Svaki uzorak vode sam analizirala u triplikatom, a kontrolu u šest ponavljanja.

Kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$) sam koristila kao referentnu tvar za pozitivnu kontrolu. U 100 mL medija sam rastopila 100 mg $K_2Cr_2O_7$ (S1). Iz te sam otopine otpipetirala 1 mL i prebacila u odmjernu tikvicu od 100 mL (S2) te medijem dopunila do oznake kako bi dobila otopinu koncentracije 10 mg L^{-1} . Zatim sam tu otopinu razrijedila medijem prema **tablici 5**, kako bih dobila seriju od pet koncentracija između 1,8 i $0,18 \text{ mg L}^{-1}$. U tikvicu C1 sam dodala 18 mL otopine iz S2, u C2 10 mL, u C3 5,6 mL, u C4 3,2 mL i u C5 1,8 mL otopine iz S2. Svaku odmjernu tikvicu sam napunila medijem do oznake i dodala 1 mL suspenzije algi te prelila otopine u kivete za spektrofotometriju. Za referentnu tvar sam odredila EC_{50} vrijednost, odnosno koncentraciju koja izaziva 50 % - tnu inhibiciju rasta algi.

Tablica 4. Serija razrjeđenja uzoraka vode.

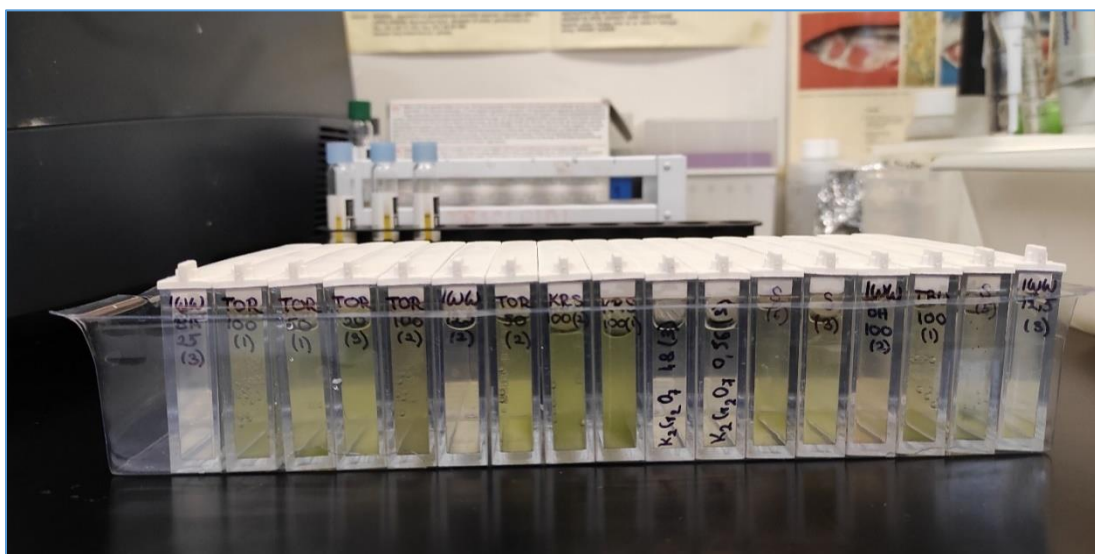
| <i>lokalitet</i> | <i>koncentracija (%)</i> |
|------------------------------------|--------------------------|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 100,00 |
| | 100,00 |
| | 50,00 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 25,00 |
| | 12,50 |
| | 6,25 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 100,00 |
| | 50,00 |
| Krka kod Knina (KRK) | 100,00 |
| | 50,00 |
| | 25,00 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 100,00 |

Tablica 5. Serija razrjeđenja referentne tvari ($K_2Cr_2O_7$).

| <i>tikvica</i> | <i>c ($K_2Cr_2O_7$) ($mg L^{-1}$)</i> |
|----------------|---|
| C1 | 1,80 |
| C2 | 1,00 |
| C3 | 0,56 |
| C4 | 0,32 |
| C5 | 0,18 |

4.2.4. Inkubacija uzoraka i mjerenje optičke gustoće

Pripremljene sam otopine prelila u kivete od 10 cm i posložila kivete na stalak nasumičnim redoslijedom (**Slika 8.**). Odmah nakon pripreme uzoraka, izmjerila sam početnu (nulti sat) optičku gustoću algi pomoću UV/VIS spektrofotometra DR6000 (Hach, SAD) na 670 nm, a mjerenja sam ponovila nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (**Slika 9.**). Uzorci su inkubirani u uređaju TC 135 S (Aqualytic, Njemačka) na 23 °C (± 2 °C) s kontinuiranim osvjetljenjem 10 000 lux (**Slika 10.**). Iz dobivenih vrijednosti izračunala sam prosjek specifičnog rasta i postotak inhibicije prema ISO 8692 (2012) te sam odredila najvišu koncentraciju pri kojoj nije uočena inhibicija rasta algi, odnosno LID_A vrijednost (eng. *Lowest Ineffective Dilution*).



Slika 8. Kivete s uzorcima posložene nasumičnim redoslijedom (fotografiju izradila: Amalia Brkić).



Slika 9. Mjerenje optičke gustoće algi na UV/VIS spektrofotometru DR6000 (Hach, SAD) nakon pripreme uzoraka te nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije (fotografiju izradila: dr. sc. Želimira Cvetković).



Slika 10. Unutrašnjost inkubatora TC 135 S (Aqualytic, Njemačka) s uzorcima. Uzorci su inkubirani na 23 °C (\pm 2 °C) s kontinuiranim osvjetljenjem 10 000 lux (fotografiju izradila: dr. sc. Želimira Cvetković).

5. Rezultati

5.1. Fizikalno-kemijski čimbenici

Jedino se na referentnoj postaji (KRS) sve vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika nalaze unutar graničnih vrijednosti. Tijekom sve tri sezone mjerenja na svim lokalitetima temperatura vode se kretala od 9,6 °C do 18,6 °C, gdje su najviše temperature izmjerene ljeti, a najniže u jesen. Voda na lokalitetu KRS (izvoru rijeke) je u sve tri sezone bila najbistrija i imala najmanje ukupno otopljenih tvari, dok je na lokalitetu IWW voda bila najzamućenija i sadržavala najveću količinu otopljenih tvari. Na svim je lokalitetima izmjerena замуćenost bila najviša u proljeće, a najniža u jesen, osim na lokaciji KRK, koja je u jesen imala najvišu замуćenost u odnosu na proljeće i ljeto. Električna vodljivost je iznosila od 388 do 10570 $\mu\text{S cm}^{-1}$, gdje je najniža vrijednost izmjerena u proljeće, a najviša u jesen. Tijekom sve tri sezone, na lokalitetu KRS je izmjerena najniža (proljeće: 388 $\mu\text{S cm}^{-1}$, ljeto: 451 $\mu\text{S cm}^{-1}$, jesen: 435 $\mu\text{S cm}^{-1}$), a na lokalitetu IWW najviša električna vodljivost u odnosu na sve ostale lokacije (proljeće: 3280 $\mu\text{S cm}^{-1}$, ljeto: 5460 $\mu\text{S cm}^{-1}$, jesen: 10570 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (**Tablice 6A, 7A. i 8A.**). Također, na lokalitetu KRS je izmjerena najmanja količina ukupno otopljenih tvari tijekom sve tri sezone mjerenja (proljeće: 193,9 mg L⁻¹, ljeto: 226,0 mg L⁻¹, jesen: 216,0 mg L⁻¹), a na lokalitetu IWW najveća količina ukupno otopljenih tvari tijekom sve tri sezone (proljeće: 1642,0 mg L⁻¹, ljeto: 2750,0 mg L⁻¹, jesen: 5290,0 mg L⁻¹). U sve tri sezone mjerenja, najveće količine ukupno otopljenih tvari su izmjerene u jesen (**Tablice 6A, 7A. i 8A.**). Najniža pH vrijednost je izmjerena na lokalitetu IWW u proljeće (7,32), a najviša na lokalitetu TBU u proljeće i ljeto (8,20). Tijekom sve tri sezone mjerenja pH je uvijek bio najviši na lokalitetu TBU (**Tablice 6A, 7A. i 8A.**). Vrijednosti otopljenog kisika kretale su se u rasponu od 8,29 mg O₂ L⁻¹ do 10,62 mg O₂ L⁻¹, gdje je najniža vrijednost zabilježena na lokalitetu TOR u jesen, a najviša na lokalitetu TBU u proljeće i ljeto, odnosno na lokalitetu KRK u proljeće (**Tablice 6A, 7A. i 8A.**). Najniže zasićenje kisikom je bilo na lokaciji TOR u proljeće i iznosilo je 85,2 %, a najveće je iznosilo 103,8 % na lokaciji KRS u jesen (**Tablice 6A, 7A. i 8A.**). Vrijednosti otopljenog CO₂ kretale su se od 1,60 mg L⁻¹ koja je izmjerena na lokalitetu TBU u ljeto do 31,00 mg L⁻¹ koja je izmjerena na lokalitetu KRK u proljeće. Vrijednosti kemijske potrošnje kisika kretale su se od 0,19 mg O₂ L⁻¹ do 3030,00 mg O₂ L⁻¹. Najniža vrijednost zabilježena je na lokalitetu KRS u proljeće, a najviša na lokalitetu IWW u istoj sezoni (**Tablice 6B, 7B. i 8B.**). I najniža i najviša koncentracija amonijaka izmjerene su u ljeto, najniža na lokalitetu KRS (0,01 mg N L⁻¹), a najviša na lokalitetu IWW (21,00 mg N L⁻¹) (**Tablice 6B, 7B. i 8B.**). Vrijednosti ukupnog dušika uvijek su bile najniže

na lokalitetu KRS s najnižom izmjerenom u proljeće ($0,1 \text{ mg N L}^{-1}$), a najviše na lokalitetu IWW s najvišom izmjerenom u jesen ($69,0 \text{ mg N L}^{-1}$) (**Tablice 6B, 7B. i 8B.**). Koncentracija nitrata se kretala od $0,02 \text{ mg N L}^{-1}$ izmjerene na lokalitetu TOR u ljeto, do $7,09 \text{ mg N L}^{-1}$ na lokalitetu IWW u proljeće (**Tablice 6B, 7B. i 8B.**). Na lokalitetu KRS u ljeto je izmjerena najmanja koncentracija nitrita ($<0,001 \text{ mg N L}^{-1}$), dok je najveća koncentracija izmjerena na lokalitetu IWW u jesen ($9,090 \text{ mg N L}^{-1}$) (**Tablice 6B, 7B. i 8B.**). Najmanja i najveća koncentracija ukupnog fosfora izmjerene su u ljeto. Najmanja na lokalitetu KRS ($0,003 \text{ mg P L}^{-1}$), a najveća na lokalitetu IWW ($8,540 \text{ mg P L}^{-1}$) (**Tablice 6B, 7B. i 8B.**).

U proljeće je na lokalitetima KRS, TOR; KRK i TBU zamućenost vode bila ispod 10 FAU, a temperatura vode se kretala od $10,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $13,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, s najvišom temperaturom na lokalitetu TOR i najnižom na lokalitetu KRK. Na izvoru je izmjerena najniža kemijska potrošnja kisika ($0,19 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), dok su na ostale tri lokacije one više od granice za vrlo dobro i dobro ekološko stanje vode (**Tablice 6A. i 6B.**). Na lokalitetu TOR, koncentracija amonijaka i ukupnog dušika također prelazi granične vrijednosti, dok je na lokalitetu KRK koncentracija ukupnog fosfora bila iznad granice za vrlo dobro i dobro stanje (**Tablice 6A. i 6B.**). Na lokalitetu IWW voda je bila izrazito zamućena (2355 FAU) te nije bilo moguće odrediti temperaturu, otopljeni kisik i zasićenje kisikom jer bi se sonde mogle oštetiti uranjanjem u vodu izrazito visoke zamućenosti. Na tom su lokalitetu izmjerene i najviše vrijednosti električne vodljivosti ($3280 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$), ukupno otopljenih tvari ($1642,0 \text{ mg L}^{-1}$), kemijske potrošnje kisika ($3030,00 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) te amonijaka ($7,88 \text{ mg N L}^{-1}$), nitrata ($7,09 \text{ mg N L}^{-1}$), nitrita ($0,405 \text{ mg N L}^{-1}$), ukupnog dušika ($21,2 \text{ mg N L}^{-1}$) i ukupnog fosfora ($2,210 \text{ mg P L}^{-1}$) (**Tablice 6A. i 6B.**). Vrijednosti kemijske potrošnje kisika, ukupnog dušika, nitrata i ukupnog fosfora prelazile su granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama prema Pravilniku (NN 26/2020) (**Tablica 6B.**).

Tablica 6A. Fizikalno-kemijski čimbenici vode zabilježeni na lokacijama u proljeće. Plavo obojena kućica označuje vrlo dobru kategoriju ekološkog stanja vode za dan čimbenik. Sve vrijednosti su unutar propisanih graničnih vrijednosti (prema NN 96/2019; NN 26/2020). TDS označuje ukupno otopljene tvari.

| <i>lokaliitet</i> | <i>zamućenost (FAU)</i> | <i>temperatura vode (°C)</i> | <i>električna vodljivost ($\mu S cm^{-1}$)</i> | <i>TDS ($mg L^{-1}$)</i> | <i>pH</i> | <i>otopljeni kisik ($mg O_2 L^{-1}$)</i> | <i>zasićenje kisikom ($O_2 \%$)</i> |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|---|-------------------------------------|-----------|---|--|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 0 | 10,5 | 388 | 193,9 | 7,54 | 10,39 | 96,1 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 8 | 13,5 | 1127 | 564,0 | 7,61 | 8,62 | 85,2 |
| Krka kod Knina (KRK) | 4 | 10,3 | 430 | 215,0 | 7,97 | 10,62 | 97,9 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 3 | 11,3 | 881 | 440,0 | 8,20 | 10,62 | 100,1 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 2355 | -* | 3280 | 1642,0 | 7,32 | -* | -* |

*Nije bilo moguće odrediti čimbenike *in situ* zbog jake zamućenosti vode.

Tablica 6B. Fizikalno-kemijski čimbenici vode zabilježeni na lokacijama u proljeće. Podebljane vrijednosti su izvan propisanih graničnih vrijednosti, plavo obojena kućica označuje vrlo dobru, a zelena dobru kategoriju ekološkog stanja vode za dan čimbenik (prema NN 96/2019; NN 26/2020). KPK označuje kemijsku potrošnju kisika.

| <i>lokaliitet</i> | <i>otopljeni CO_2 ($mg L^{-1}$)</i> | <i>KPK / Mn ($mg O_2 L^{-1}$)</i> | <i>amonijak ($mg N L^{-1}$)</i> | <i>ukupni dušik ($mg N L^{-1}$)</i> | <i>nitriti ($mg N L^{-1}$)</i> | <i>nitriti ($mg N L^{-1}$)</i> | <i>ukupni fosfor ($mg P L^{-1}$)</i> |
|---------------------------------|---|--|--|--|---|---|---|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 4,70 | 0,19 | 0,02 | 0,1 | 0,08 | 0,014 | 0,009 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 2,70 | 11,00 | 0,19 | 1,9 | 0,22 | 0,021 | 0,053 |
| Krka kod Knina (KRK) | 31,00 | 8,83 | 0,04 | 0,8 | 0,15 | 0,017 | 0,084 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 1,10 | 4,60 | 0,02 | 0,6 | 0,11 | 0,019 | 0,012 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 14,01 | 3030,00 | 7,88 | 21,2 | 7,09 | 0,405 | 2,210 |

U ljeto je na lokalitetima KRS, TOR, KRK i TBU zamućenost vode bila ispod 5 FAU, a temperatura se kretala od 10,5 °C do 18,6 °C, s najvišom temperaturom na lokalitetu TOR i najnižom na izvoru (**Tablica 7A.**). Na lokalitetu KRK izmjerena kemijska potrošnja kisika, koncentracija amonijaka, ukupnog dušika i ukupnog fosfora prelazi granicu za vrlo dobro i dobro ekološko stanje. Granične vrijednosti također prelazi i vrijednost ukupnog fosfora za lokalitet TOR te vrijednost kemijske potrošnje kisika za lokalitet TBU (**Tablice 7A. i 7B.**). Na lokalitetu IWW voda je ponovo bila najzamućenija (35 FAU) te nije bilo moguće odrediti temperaturu, otopljeni kisik i zasićenje kisikom. Na tom su lokalitetu izmjerene i najviše vrijednosti električne vodljivosti (5460 $\mu\text{S cm}^{-1}$), ukupno otopljenih tvari (2750,0 mg L^{-1}), kemijske potrošnje kisika (2770,00 $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) te amonijaka (21,00 mg N L^{-1}), nitrata (3,07 mg N L^{-1}), nitrita (1,230 mg N L^{-1}), ukupnog dušika (60,0 mg N L^{-1}) i ukupnog fosfora (8,540 mg P L^{-1}) (**Tablice 7A. i 7B.**). Vrijednosti kemijske potrošnje kisika, amonijaka, ukupnog dušika, nitrata, nitrita i ukupnog fosfora prelazile su granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama prema Pravilniku (NN 26/2020) (**Tablica 7B.**).

Tablica 7A. Fizikalno-kemijski čimbenici vode zabilježeni na lokacijama u ljeto. Plavo obojena kućica označuje vrlo dobru kategoriju ekološkog stanja vode za dan čimbenik. Sve vrijednosti su unutar propisanih graničnih vrijednosti (prema NN 96/2019; NN 26/2020). TDS označuje ukupno otopljene tvari.

| <i>lokalitet</i> | <i>zamućenost (FAU)</i> | <i>temperatura vode (°C)</i> | <i>električna vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)</i> | <i>TDS (mg L^{-1})</i> | <i>pH</i> | <i>otopljeni kisik ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)</i> | <i>zasićenje kisikom ($\text{O}_2 \%$)</i> |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|---|--|-----------|--|---|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 0 | 10,5 | 451 | 226,0 | 7,58 | 10,5 | 95,6 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 3 | 18,6 | 540 | 320,0 | 7,48 | 8,29 | 88,6 |
| Krka kod Knina (KRK) | 4 | 14,9 | 581 | 291,0 | 7,92 | 9,26 | 93,9 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 4 | 15,0 | 881 | 440,0 | 8,20 | 10,62 | 100,1 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 35 | -* | 5460 | 2750,0 | 7,75 | -* | -* |

*Nije bilo moguće odrediti čimbenike *in situ* zbog jake zamućenosti vode.

Tablica 7B. Fizikalno-kemijski čimbenici vode zabilježeni na lokacijama u ljeto. Podebljane vrijednosti su izvan propisanih graničnih vrijednosti, plavo obojena kućica označuje vrlo dobru, a zelena dobru kategoriju ekološkog stanja vode za dan čimbenik (prema NN 96/2019; NN 26/2020). KPK označuje kemijsku potrošnju kisika.

| <i>lokalitet</i> | <i>otopljeni CO₂</i> (mg L ⁻¹) | <i>KPK / Mn</i> (mg O ₂ L ⁻¹) | <i>amonijak</i> (mg N L ⁻¹) | <i>ukupni dušik</i> (mg N L ⁻¹) | <i>nitriti</i> (mg N L ⁻¹) | <i>nitriti</i> (mg N L ⁻¹) | <i>ukupni fosfor</i> (mg P L ⁻¹) |
|---------------------------------|--|---|--|--|---|---|---|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 4,00 | 0,72 | 0,01 | 0,2 | 0,04 | <0,001 | 0,003 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 1,70 | 3,02 | 0,02 | 0,5 | 0,02 | 0,003 | 0,086 |
| Krka kod Knina (KRK) | 4,10 | 165,50 | 4,60 | 6,5 | 0,41 | 0,052 | 0,890 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 1,60 | 4,41 | 0,05 | 0,8 | 0,10 | 0,011 | 0,014 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 8,80 | 2770,00 | 21,00 | 60,0 | 3,07 | 1,230 | 8,540 |

U jesen je na lokalitetima KRS, TOR, KRK i TBU zamućenost vode bila ispod 5 FAU, a temperatura se kretala od 9,6 °C na lokalitetu TBU do 11,7 °C, na lokalitetu KRK (**Tablica 8A.**). Kao i u ljeti, na lokalitetu KRK izmjerena kemijska potrošnja kisika, koncentracija amonijaka, ukupnog dušika i ukupnog fosfora prelazila je granicu za vrlo dobro i dobro ekološko stanje. Viša koncentracija amonijaka i ukupnog dušika izmjerena je i na lokaciji TOR (**Tablice 8A. i 8B.**). Na lokalitetu IWW voda je bila najzamućenija (15 FAU) te nije bilo moguće odrediti temperaturu, otopljeni kisik i zasićenje kisikom kao ni u prethodne dvije sezone mjerenja. Na tom su lokalitetu izmjerene najviše vrijednosti električne vodljivosti (10570 μS cm⁻¹), koncentracija ukupno otopljenih tvari (5290,0 mg L⁻¹), koncentracija otopljenog CO₂ (9,10 mg L⁻¹), kemijske potrošnje kisika (101,70 mg O₂ L⁻¹) te amonijaka (2,40 mg N L⁻¹), nitrata (3,07 mg N L⁻¹), nitrita (9,090 mg N L⁻¹), ukupnog dušika (69,0 mg N L⁻¹) i ukupnog fosfora (1,300 mg P L⁻¹) (**Tablice 8A. i 8B.**). Vrijednosti ukupnog dušika, nitrata i nitrita prelazile su granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama prema Pravilniku (NN 26/2020) (**Tablica 8B.**).

Tablica 8A. Fizikalno-kemijski čimbenici vode zabilježeni na lokacijama u jesen. Plavo obojena kućica označuje vrlo dobru kategoriju ekološkog stanja vode za dan čimbenik. Sve vrijednosti su unutar propisanih graničnih vrijednosti (prema NN 96/2019; NN 26/2020). TDS označuje ukupno otopljene tvari.

| <i>lokaliitet</i> | <i>zamućenost (FAU)</i> | <i>temperatura vode (°C)</i> | <i>električna vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)</i> | <i>TDS (mg L^{-1})</i> | <i>pH</i> | <i>otopljeni kisik ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)</i> | <i>zasićenje kisikom ($\text{O}_2 \%$)</i> |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|---|--|-----------|---|---|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 0 | 10,0 | 435 | 216,0 | 7,51 | 10,00 | 103,8 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 2 | 10,2 | 806 | 403,0 | 7,54 | 8,29 | 88,6 |
| Krka kod Knina (KRK) | 5 | 9,6 | 489 | 291,0 | 7,78 | 10,29 | 91,6 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 1 | 11,7 | 955 | 478,0 | 8,10 | 9,50 | 88,7 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 15 | -* | 10570 | 5290,0 | 7,89 | -* | -* |

*Nije bilo moguće odrediti čimbenike *in situ* zbog jake zamućenosti vode.

Tablica 8B. Fizikalno-kemijski čimbenici vode zabilježeni na lokacijama u jesen. Podebljane vrijednosti su izvan propisanih graničnih vrijednosti, plavo obojena kućica označuje vrlo dobru, a zelena dobru kategoriju ekološkog stanja vode za dan čimbenik (prema NN 96/2019; NN 26/2020). KPK označuje kemijsku potrošnju kisika.

| <i>lokaliitet</i> | <i>otopljeni CO₂ (mg L^{-1})</i> | <i>KPK / Mn ($\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$)</i> | <i>amonijak ($\text{mg N L}^{-1}$)</i> | <i>ukupni dušik (mg N L^{-1})</i> | <i>nitriti (mg N L^{-1})</i> | <i>nitriti (mg N L^{-1})</i> | <i>ukupni fosfor (mg P L^{-1})</i> |
|---------------------------------|---|--|---|---|--|--|--|
| izvor rijeke Krke (KRS) | 5,70 | 0,98 | 0,02 | 0,3 | 0,11 | 0,008 | 0,004 |
| pritoka Orašnica (TOR) | 2,00 | 1,74 | 0,07 | 1,8 | 0,25 | 0,028 | 0,017 |
| Krka kod Knina (KRK) | 3,60 | 4,18 | 0,09 | 3,0 | 0,21 | 0,022 | 0,087 |
| pritoka Butišnica (TBU) | 4,90 | 3,11 | 0,03 | 0,8 | 0,03 | 0,009 | 0,037 |
| industrijska otpadna voda (IWW) | 9,10 | 101,70 | 2,40 | 69,0 | 3,07 | 9,090 | 1,300 |

Prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019), u proljeće je jedino na lokalitetu KRS ekološko stanje površinske vode ocijenjeno kao dobro, dok je ekološko stanje ostalih površinskih voda (TOR, KRK, TBU) ocijenjeno kao umjereno (**Tablica 1., 6A. i 6B.**). U ljeto je lokalitet izvor rijeke Krke (KRS) imao vrlo dobro ekološko stanje (bolje nego u proljeće), a ostali lokaliteti (TOR, KRK, TBU) umjereno stanje kao i u proljeće (**Tablica 1., 7A. i 7B.**). Površinska voda na izvoru rijeke Krke u jesen je ponovo ocijenjena kao dobro ekološko stanje. Također, stanje površinske vode rijeke Butišnice (TBU) je u jesen bilo dobrog ekološkog stanja, odnosno najboljeg tijekom sve tri sezone mjerenja. Površinske vode rijeke Orašnice (TOR) i Krke kod Knina (KRK) su ponovo ocijenjene kao umjereno ekološko stanje (**Tablica 1., 8A. i 8B.**) (NN 96/2019).

5.2. Test toksičnosti

5.2.1. Optička gustoća

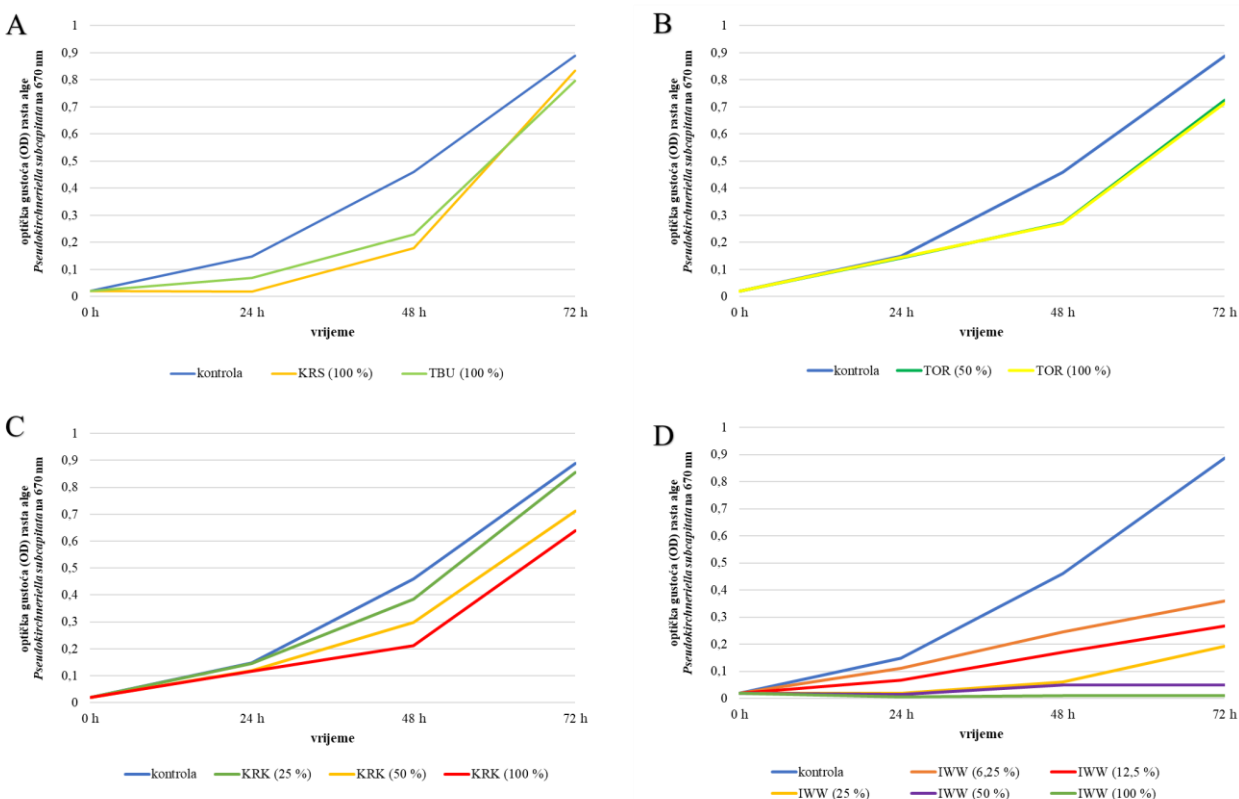
Mjerenja pokazuju da s vremenom dolazi do povećanja vrijednosti optičke gustoće u uzorcima, odnosno dolazi do povećanja broja stanica algi.

U prvoj sezoni mjerenja na uzorcima vode KRS, TBU, TOR i KRK uočen je rast alge *P. subcapitata*. Nakon 72 sata uzorci vode KRS (100 %), TBU (100 %) te uzorak vode KRK (25 %) imali su najveće vrijednosti optičke gustoće (KRS (100 %) = 0,834, TBU (100 %) = 0,797, KRK (25 %) = 0,856 (**Slike 11A., 11B. i 11C.**)). Najmanje vrijednosti optičke gustoće nakon 72 sata uočene su na uzorku IWW pri svim koncentracijama (IWW (100 %) = 0,010, IWW (50 %) = 0,050, IWW (25 %) = 0,192, IWW (12,5 %) = 0,267; IWW (6,25 %) = 0,359) (**Slika 11D.**). Jedino je na uzorku IWW (100 %) uočen pad vrijednosti optičke gustoće s vremenom gdje je početna optička gustoće iznosila 0,020, a nakon 72 sata izmjerena je optička gustoća iznosila 0,010 (**Slika 11D.**)).

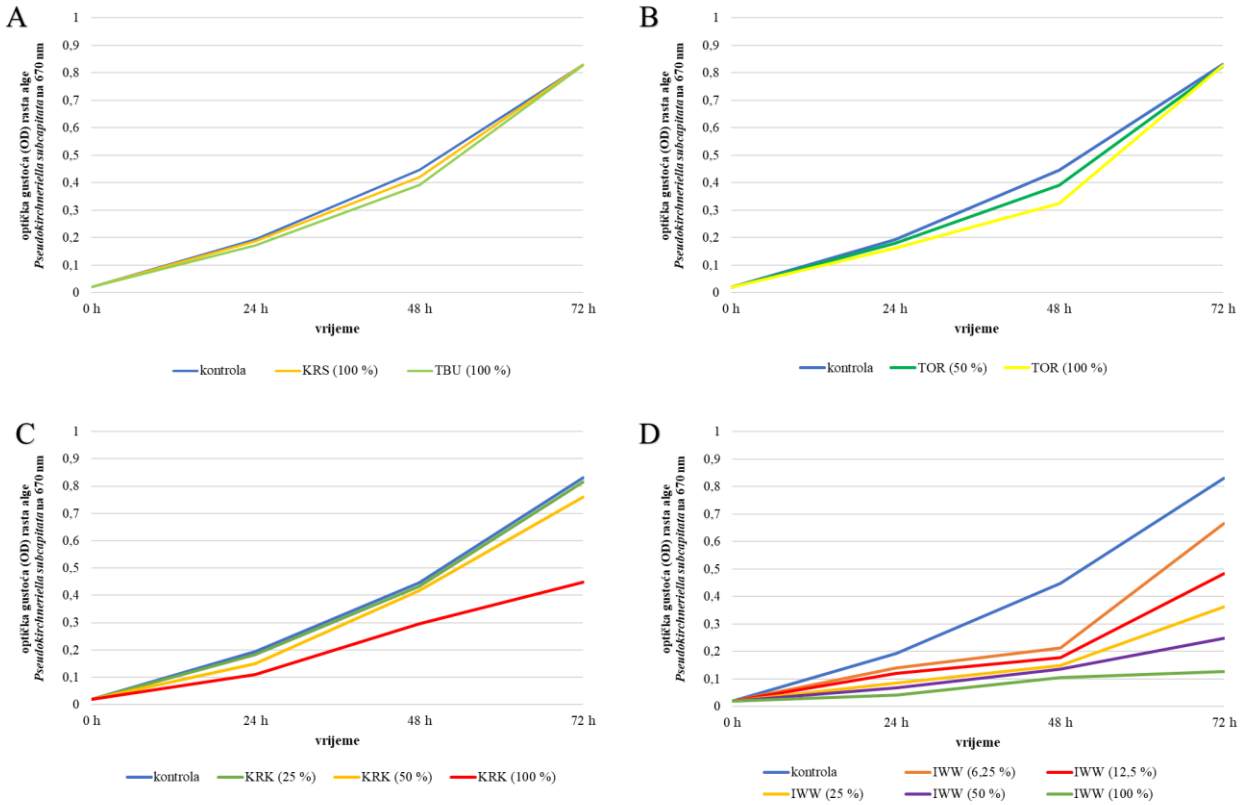
U drugoj sezoni mjerenja, nakon 72 sata uzorci vode KRS (100 %) i TBU (100 %) imali su najveće vrijednosti optičke gustoće (KRS (100 %) = 0,829, TBU (100 %) = 0,829) (**Slika 12A.**) te nešto nižu za uzorak vode TOR (TOR (100 %) = 0,826) (**Slika 12B.**). Najmanje vrijednosti optičke gustoće nakon 72 sata uočene su na uzorku KRK (100 %) = 0,448 (**Slika 12C.**) te na uzorku IWW pri svim koncentracijama (IWW (100 %) = 0,128, IWW (50 %) = 0,249, IWW (25 %) = 0,363, IWW (12,5 %) = 0,484; IWW (6,25 %) = 0,665) (**Slika 12D.**)).

I u trećoj sezoni mjerenja nakon 72 sata uzorci vode KRS (100 %), TBU (100 %) i TOR (50 %) su imali najveće vrijednosti optičke gustoće (KRS (100 %) = 0,738, TBU (100 %) = 0,757,

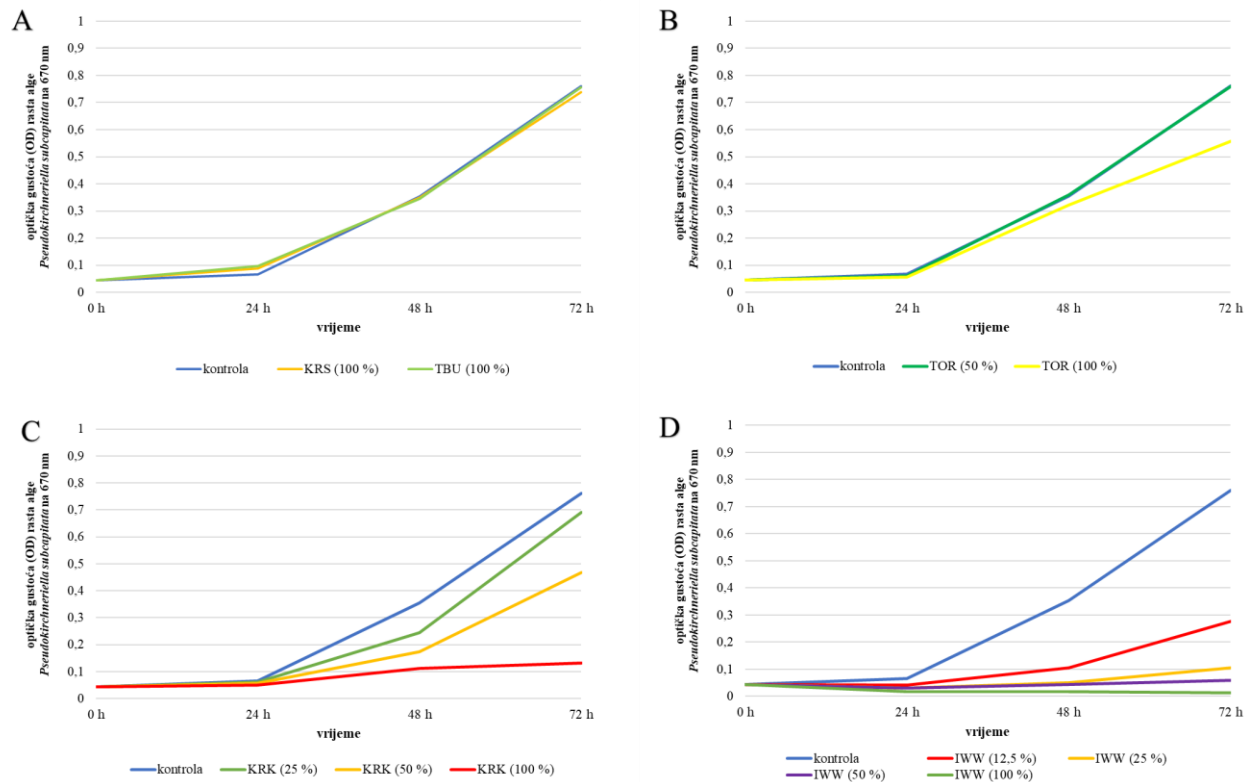
TOR (50 %) = 0,759) (Slike 12A. i 12B.). Najmanje vrijednosti optičke gustoće nakon 72 sata uočene su na uzorku KRK (100 %) = 0,132 (Slika 13C.) te na uzorku IWW pri svim koncentracijama (IWW (100 %) = 0,013, IWW (50 %) = 0,059, IWW (25 %) = 0,106, IWW (12,5 %) = 0,276) (Slika 13D.). Jedino je na uzorku IWW (100 %) uočen pad vrijednosti optičke gustoće s vremenom gdje je početna optička gustoća iznosila 0,044, a nakon 72 sata izmjerena je optička gustoća iznosila 0,013 (Slika 13D.).



Slika 11. Optička gustoća (OD) rasta alge *Pseudokirchneriella subcapitata* na 670 nm tijekom trajanja testa (72 h) za uzorke uzrokovane u proljeće 2021.: A) postaje KRS i TBU, B) postaja TOR, C) postaja KRK i D) postaja IWW.



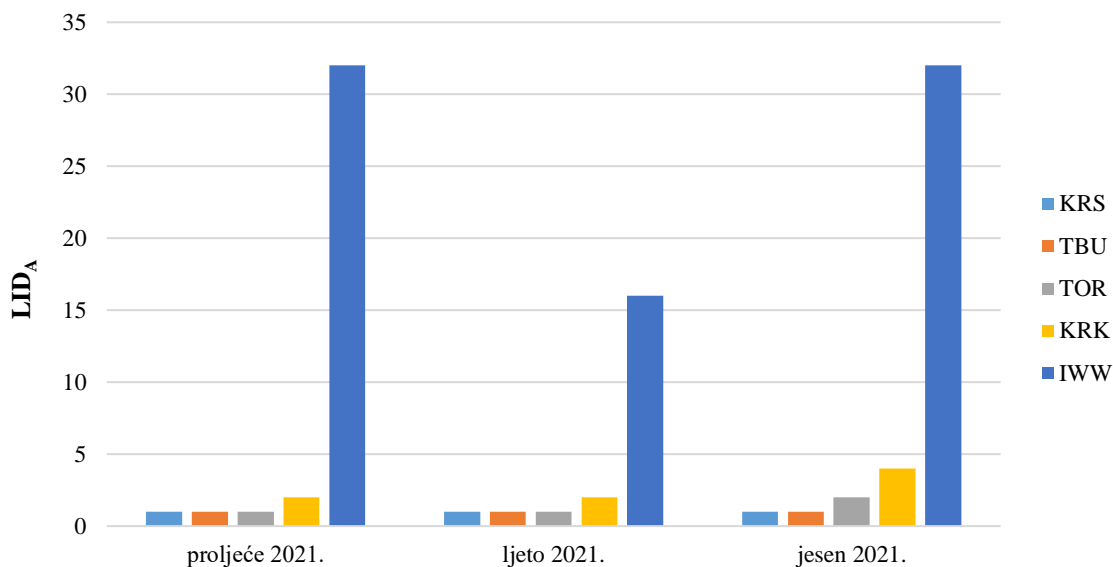
Slika 12. Optička gustoća (OD) rasta alge *Pseudokirchneriella subcapitata* na 670 nm tijekom trajanja testa (72 h) za uzorke uzrokovane u ljeto 2021.: A) postaje KRS i TBU, B) postaja TOR, C) postaja KRK i D) postaja IWW.



Slika 13. Optička gustoća (OD) rasta alge *Pseudokirchneriella subcapitata* na 670 nm tijekom trajanja testa (72 h) za uzorke uzrokovane u jesen 2021.: A) postaje KRS i TBU, B) postaja TOR, C) postaja KRK i D) postaja IWW.

5.2.2. LID_A vrijednost

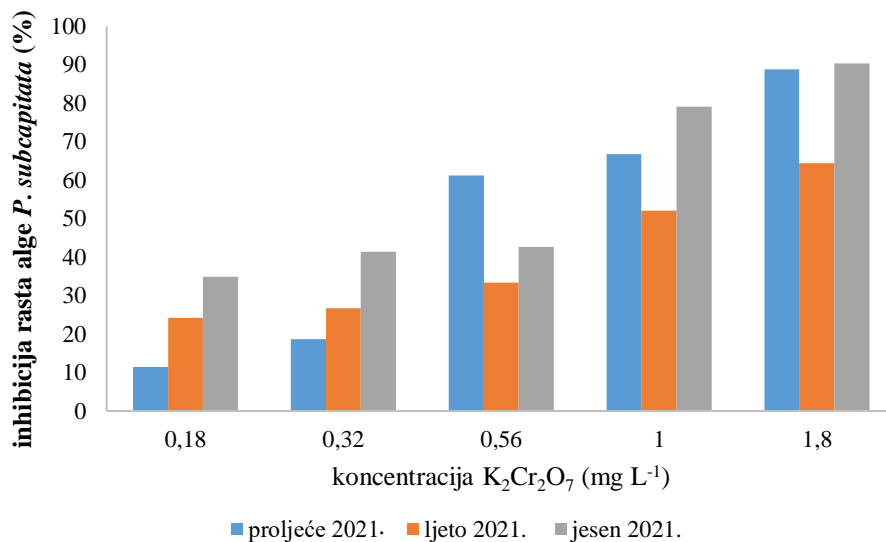
Za uzorke KRS, TOR i TBU iz proljeća dobivena LID_A vrijednost je jednaka jedan, dok je LID_A nešto veća za uzorak KRK ($LID_A = 2$). Najviša LID_A vrijednost uočena je na uzorku IWW ($LID_A = 32$) (**Slika 14.**). Na uzorcima vode KRS, TOR, TBU i KRK iz ljeta, dobivene su iste LID_A vrijednosti kao iz sezone ranije, a uzorak IWW je pokazao manju toksičnost nego uzorak iz proljeća ($LID_A = 16$) (**Slika 14.**). Uzorci vode KRS i TOR uzrokovani u jesen imaju istu LID_A vrijednost kao uzorci iz proljeća i ljeta, dok su za uzorke vode TBU i KRK dobivene više vrijednosti (LID_A (TBU) = 2, LID_A (KRK) = 4). Ponovo je najviša LID_A vrijednost dobivena za uzorak IWW ($LID_A = 32$) (**Slika 14.**).



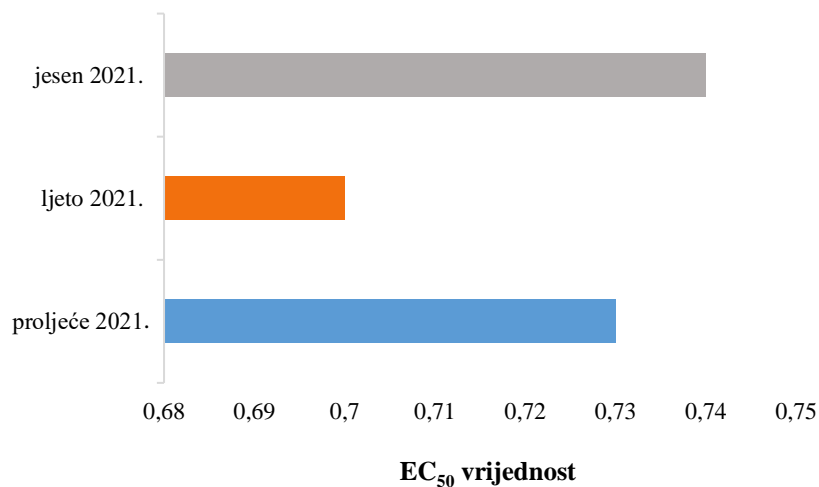
Slika 14. Usporedba LID_A vrijednosti dobivenih testom toksičnosti na algi *Pseudokirchneriella subcapitata* tijekom tri sezone mjerenja.

5.2.3. EC_{50} vrijednosti za referentnu tvar

Inhibicija rasta alge *P. subcapitata* testovima provedenima s kalijevim dikromatom, kao referentnom tvari tijekom svakog provođenja testa u proljeće, ljeto i jesen prikazana je na **slici 15**. Na temelju dobivenih rezultata izračunata je srednja učinkovita koncentracija (EC_{50}) koje je iznosila $0,73 \text{ mg L}^{-1}$ (kod testova provedenih paralelno s uzorcima uzorkovanim u proljeće), $0,74 \text{ mg L}^{-1}$ (kod testova provedenih paralelno s uzorcima uzorkovanim u ljeto), odnosno $0,70 \text{ mg L}^{-1}$ (kod testova provedenih paralelno s uzorcima uzorkovanim u jesen) (**Slika 16**).



Slika 15. Inhibicija rasta alge *Pseudokirchneriella subcapitata* testovima provedenim s kalijevim dikromatom, K₂Cr₂O₇, kao referentnom tvari, u proljeće, ljeto i jesen 2021. godine.



Slika 16. EC₅₀ vrijednosti za kalijev dikromat kod testova toksičnosti provedenih u proljeće, ljeto i jesen 2021. godine na algi *Pseudokirchneriella subcapitata*.

6. Rasprava

Područja uz tokove rijeke Krke i njenih pritoka su naseljena i izložena antropogenom utjecaju. Od početka 20. stoljeća rijeka Krka se iskorištava za vodoopskrbu, dobivanje električne energije, industriju i poljoprivredu te se u nju svakodnevno ispuštaju industrijske i komunalne otpadne vode (Marguš 2007; Lozić i sur. 2014). Uz sve navedeno, prijetnju predstavljaju i ilegalna odlagališta otpada. Kako se radi o krškom području, štetne tvari se procjeđuju u podzemlje te brzo i lako može doći do onečišćenja podzemnih voda što uključuje i onečišćenje vodocrpilišta pitke vode. Kao i donji tok rijeke Krke koji je zaštićen kao Nacionalni park, i gornji tok ima preduvjete za iskorištavanje u turističke svrhe razvojem različitih oblika turizma poput planinarenja, raftinga i ribolova (Lozić i sur. 2014). Iz tog je razloga važno kontinuirano obavljati monitoring područja kako bi se dobio uvid u ekološko i kemijsko stanje voda te kako bi se pravovremeno moglo reagirati ukoliko dođe do zagađenja.

6.1. Ekološko stanje površinskih voda obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike

Praćenje fizikalno-kemijskih čimbenika voda od velike je važnosti, jer su oni pouzdani pokazatelji općeg stanja. Tijekom sve tri sezone jedino su na referentnoj postaji (KRS) sve vrijednosti fizikalno-kemijskih čimbenika bile unutar graničnih vrijednosti, čime je dokazano da je izvor rijeke poslužio kao dobra referentna lokacija te je ukazalo na slabiju kvalitetu voda na ostalim lokalitetima.

Prema Izvješću o stanju površinskih voda u 2019. godini (2020), fizikalno-kemijski čimbenici za površinske vode na lokalitetima KRS i KRK su ukazali na dobro ekološko stanje, za lokalitet TOR na dobro, a za lokalitet TBU nema mjerenja (Musić i sur. 2020). Prema mjerenjima dvije godine kasnije (što je obrađeno u sklopu ovog diplomskog rada), površinska voda na lokalitetu KRS također je dobrog ekološkog stanja, ali su površinske vode na lokalitetu KRK, TOR i TBU umjerenog ekološkog stanja. Voda uzeta iz laguna s industrijskom vodom (IWW) je lošeg ekološkog stanja, jer vrijednosti većine čimbenika prelaze dopuštene granice. Umjereno ekološko stanje rijeke Krke kod grada Knina ukazuje na onečišćenje vode što predstavlja potencijalnu opasnost za područje NP Krka koje se nalazi 2 km nizvodno.

6.1.1. Mutnoća vode

Mutnoća vode ukazuje na moguće pogoršanje kakvoće vode. Zamućenje vode ovisi o koncentraciji čestica u vodi i njihovoj veličini, valnoj duljini ulaznog zračenja te u krškom području, o cirkulaciji vode kroz krške provodnike. Do prirodnog zamućenja vode može doći uslijed kratkih intenzivnih oborina koje uzrokuju eroziju materijala na površini slijeva i nagli porast podzemnih voda. Ispiranje umjetnih gnojiva sa poljoprivrednih površina, ispuštanje otpadne vode u okoliš te gradnja infrastrukture za potrebe urbanizacije su najčešći antropogeni uzroci zamućenja vode (Bonacci 2016). Na izvoru rijeke Krke (KRS) voda je najbistrija, a kretanjem nizvodno uočen je porast zamućenja. Očekivano, zamućenost vode je najveća u lagunama s ispustima industrijske vode (IWW) te na lokalitetu KRK uz ispuste komunalnih voda grada Knina, gdje dolazi do unosa veće koncentracije suspendiranih tvari i mikroorganizama iz nedostavno pročišćene otpadne vode. Dugotrajna zamućenost negativno utječe na ekosustav, jer onemogućuje prodor svjetlosti do primarnih proizvođača, što negativno utječe na njihov rast i razvoj te remeti hranidbene mreže.

6.1.2. Temperatura vode

Temperatura je jedan od najbitnijih abiotičkih čimbenika jer je većina vodenih organizama ektotermna (beskralježnjaci, ribe, vodozemci), odnosno njihova tjelesna temperatura ovisi o temperaturi okoliša. Drastične promjene temperature vode utječu na metabolizam vodenih organizama, što negativno utječe na životne zajednice vodenih ekosustava. Također, povišene temperature vode pogoduju cvjetanju algi, što negativno utječe na procese fotosinteze i respiracije u vodenim ekosustavima (Dodds i Whiles 2020). Temperaturno onečišćenje voda može biti posljedica ispuštanja industrijskih otpadnih voda i komunalnih voda te površinskog otjecanja s gradskih površina, osobito tijekom kratkih intenzivnih oluja kada dolazi do jačeg površinskog ispiranja (Herb i sur. 2008). Temperatura uvjetuje i koncentraciju otopljenog kisika u vodi. S povišenjem temperature, smanjuje se koncentracija otopljenog kisika u vodi, što smanjuje dostupnost kisika za vodene organizme (Davis 2020). Izmjerene temperature na svim lokacijama tijekom sve tri sezone odražavaju sezonske promjene temperature zraka. U ljeto, kada je insolacija najveća, temperature su bile najviše, dok su u jesen bile najniže. Najmanje varijacije zabilježene su na lokalitetu KRS gdje je prisutan stalan dotok podzemne vode.

6.1.3. Ukupno otopljene tvari i električna vodljivost

Električna vodljivost vode je sposobnost vode da provodi struju. Ona ovisi o koncentraciji otopljenih tvari, vrsti otopljenih minerala i temperaturi. Vrijednost električne vodljivosti je proporcionalna s količinom ukupno otopljenih tvari (TDS). Ukupno otopljene tvari uključuju anione karbonata i bikarbonata te sulfata, nitrata i klorida, katione kalcija, natrija, kalcija, magnezija i silicija te otopljene organske tvari. Kod slatkih voda, TDS bi trebao biti ispod 1000 mg L⁻¹. Vrijednosti TDS-a ovise o klimatskim čimbenicima poput isparavanja i obilnih kiša, geomorfološkim karakteristikama područja, ali i o antropogenom utjecaju (Weber-Scannell i Duffy 2007; Dodd i Whiles 2020). Ovdje je bilo za očekivati nešto više vrijednosti električne vodljivosti, budući da se radi o krškom području, odnosno o području s topljivijim stijenama, dok bi vode na podlozi sa slabije topljivim stijenama poput granita imale nešto nižu vodljivost (Matoničkin Kepčija 2003). Za očekivati, najviša električna vodljivost je uvijek bila na lokalitetu IWW, najvjerojatnije kao posljedica ispuštanja industrijske otpadne vode u kojoj se nalazi veća količina otopljenih iona koji utječu na visoku vodljivost, a to se odrazilo i na povišenu koncentraciju ukupno otopljenih tvari (TDS) (Baird i sur. 2017). Kao posljedica ulaska otpadnih voda u površinski tok Orašnice, visoka vodljivost i TDS prisutni su i nizvodno od lokaliteta IWW, prije ulijevanja u rijeku Krku. Nadalje, visoke vrijednosti su zabilježene i na lokalitetu TBU, što je vjerojatno posljedica poljoprivredne aktivnosti uz rijeku Butišnicu. Povišene vrijednosti TDS i posljedično električne vodljivosti, negativno utječu na ekosustav, jer dolazi do promjena u sastavu vode te povišenja saliniteta. To može rezultirati nestankom vrsta netolerantnih na promjene u okolišu i smanjenjem bioraznolikosti (Weber-Scannell i Duffy 2007).

6.1.4. pH vrijednost

Jedan od najvažnijih fizikalno-kemijskih čimbenika vode je pH vrijednost koja utječe na biokemijske procese u vodi. Većina organizama može živjeti unutar određenih pH vrijednosti (6,5 – 8,5), dok sve izvan tih granica može izdržati samo malen postotak organizama. Vrijednost pH prirodnih voda ovisi o podlozi. Tamo gdje je podloga vapnenačka, vode će biti bazičnije, a u područjima gdje je sediment bogat sulfidima kiselije (Matoničkin Kepčija 2003). Do promjene prirodne pH vrijednosti dolazi zbog zagađenja, bilo direktnim ispuštanjem zagađivača ili njegovim ispiranjima s okolnih površina (gnojiva) (Baird i sur. 2017). U kiselijoj vodi povećava se topljivost

teških metala poput olova, kadmija i kroma što negativno utječe na zajednice, dok u vodama visoke pH vrijednosti amonijak postaje toksičniji za organizme (DeZuane 1997). Izmjerene pH vrijednosti na svim lokalitetima tijekom tri sezone kretale su se unutar raspona 7,4 – 8,5, što vrijedi za vodu vrlo dobrog ekološkog stanja. Izmjerene pH vrijednosti pokazuju neutralnu do blagu lužnatost vode, što je očekivano budući da je rijeka Krka krška rijeka (Korfali i Davies 2005).

6.1.5. Režim kisika i otopljeni ugljikov dioksid

Kisik u vodu ulazi iz atmosfere, a nastaje i u vodi kao produkt fotosinteze vodenih algi i biljaka. Njegova topljivost ovisi o temperaturi, salinitetu i tlaku zraka. Što je temperatura vode niža, salinitet manji i tlak zraka viši, otopit će se više kisika. Otopljeni kisik nužan je vodenim organizmima za disanje, a ujedno je potreban i za aerobnu razgradnju organske tvari. Što je njegova koncentracija veća, to se kakvoća vode smatra boljom (Dodds 2020). Postotak kisika otopljenog u vodi izražavamo kao zasićenost kisikom, stoga su ukupno otopljeni kisik i zasićenje kisikom proporcionalne vrijednosti. U pravilu, veća koncentracija kisika je prisutna u gornjim, hladnijim i turbulentnijim dijelovima toka, dok se nizvodno smanjuje kako dolazi do laminarnog strujanja vode i povišenja temperature. Ako je zasićenost kisika u vodi ispod 80 % govorimo o povećanoj potrošnji kisika (Matoničkin Kepčija 2003; Dodds 2020). Do smanjenja zasićenosti kisikom dolazi uslijed razgradnje organske tvari. Organska tvar se prirodno nalazi u vodama, ali se njena količina može povećati ljudskim utjecajem. Upravo ispuštanjem otpadnih voda u rijeku Krku, u ekosustav ulazi dodatna količina organske tvari. Koncentracija otopljenog kisika i postotak zasićenja kisikom su na svim lokalitetima u normalnim vrijednostima. Najmanje vrijednosti izmjerene su na lokalitetu TOR koji se nalazi nizvodno od tvornice vijaka. Iako na lokalitetu IWW nije bilo moguće izmjeriti vrijednosti otopljenog kisika i zasićenja kisikom, upravo bi se tamo mogla očekivati značajna potrošnja kisika radi ispuštanja industrijskih voda. Kemijska potrošnja kisika (KPK) je mjera svih organskih i anorganskih spojeva u vodi koji mogu oksidirati u kontaktu s jakim oksidansom. KPK se povisuje s povećanjem organskih spojeva i anorganskih spojeva sklonim oksidaciji (Baird i sur. 2017). Prema KPK vrijednosti, jedino je voda na izvoru rijeke Krke vrlo dobrog ekološkog stanja. Najizraženija promjena KPK vrijednosti u tri sezone je zabilježena na lokalitetu KRK u ljeto te na lokalitetu IWW u proljeće i ljeto. Takve visoke vrijednosti su vjerojatno posljedica mjerenja u vremenski bliskom periodu nakon ispuštanja otpadnih voda.

Kao i kisik, ugljikov dioksid u vodu ulazi iz atmosfere. Mikroorganizmi, biljke i životinje ga stvaraju tijekom respiracije, a autotrofni organizmi ga troše u procesu fotosinteze. Koncentracije ugljikovog dioksida u vodi u pravilu su obrnuto proporcionalne s koncentracijom kisika u vodi. Koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida u vodi ukazuje na produktivnost sustava i indikator je onečišćenja (Neal i sur. 1998). Njegova topljivost u vodi ovisi o temperaturi vode. S povišenjem temperature, topljivost ugljikovog dioksida se smanjuje i ujedno se smanjuje koncentracija hidrogenkarbonata, a pojačava se taloženje kalcijeva karbonata (Tolić 2013). Suprotno, veća koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida rezultira većom topljivosti karbonata iz karbonatne podloge i time većim alkalitetom. Alkalitet je mjera puferske sposobnosti vode da održava pH vrijednost u određenim granicama. Upravo je to i vidljivo iz rezultata, gdje su uočene male razlike minimalnih i maksimalnih pH vrijednosti na svakom lokalitetu (Boyd 2000). Vrlo visoke koncentracije otopljenog ugljikovog dioksida u vodi uzrokuju njegovo nakupljanje u krvi organizama što ima narkotični efekt i može uzrokovati smrt organizama. Na lokalitetu KRS, izvoru rijeke Krke, koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida je u pravilu bila nešto viša od koncentracije na nizvodnim lokalitetima. To je rezultat izbijanja podzemne vode bogate ugljikovim dioksidom, čija se koncentracija smanjuje nizvodno. Viša koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida na izvoru odgovara i nešto nižim pH vrijednostima na istom lokalitetu. Na lokalitetu KRK u proljeće i na lokalitetu IWW tijekom sve tri sezone, uočena je nešto viša koncentracija otopljenog ugljikovog dioksida. To je posljedica razgradnje veće količine organskog materijala koji je unesen otpadnim vodama (Barešić 2009).

6.1.6. Hranjive tvari

Dušik i fosfor su u vodi prisutni u vrlo malim količinama te stoga predstavljaju limitirajuće faktore za rast biljaka i algi. U slatkovodnim ekosustavima postoji ravnoteža njihovog unosa i izlaska. Remećenjem te ravnoteže, odnosno povećanjem neke hranjive tvari, remeti se primarna produkcija te može doći do eutrofikacije (Boyd 2000; Barešić 2009).

Dušik ulazi u vodene ekosustave kišom i pritjecanjem vode koje sadrže dušik. Njegova koncentracija u vodi ovisi o tipu oborina i karakteristikama sedimenta. Također, dušik ulazi ispiranjem tla tretiranim gnojivima i ispuštanjem nepročišćenih otpadnih voda. Većina dušika u vodenim ekosustavima je uskladištena u sedimentu kao organska tvar, a manje količine su u vodi

u obliku plinovitog dušika, amonijaka, nitrata i nitrita (Boyd 2000). Onečišćenje vode rezultira povišenim koncentracijama dušika u vodi i sedimentu, a povišene koncentracije pogoduju razvoju makrofita i algi te dolazi do preopterećenja ekosustava i pojave eutrofikacije (Matoničkin Kepčija 2003). U prirodnim vodama, koncentracije nitrata i nitrita bi trebale biti manje od 1 mg L^{-1} (Boyd 2000). To je slučaj kod većine lokaliteta iz ovog rada, gdje izmjerene koncentracije nitrata i nitrita ukazuju da je voda vrlo dobrog ili dobrog ekološkog stanja. Međutim, koncentracije nitrita, nitrata i ukupnog dušika su puno veće na lokalitetima IWW i KRK. Razlog tome može biti ispuštanje otpadnih voda, koje su umjetni izvor nitrata, bez prethodnog pravilnog tretiranja.

Amonijak, jedan od najvažnijih indikatora zagađenja vodenih tijela, produkt je raspadanja organske tvari čija prisutnost pogoduje procesu eutrofikacije. Također, u visokim koncentracijama je toksičan za organizme jer djeluje na živčani sustav (Domingues i sur. 2011; Tolić 2013). Prema mjerenjima u ovom diplomskom radu, blago povećanje koncentracije amonijaka bilo je prisutno u proljeće i jesen na lokalitetu TOR, u proljeće na lokalitetu IWW i u jesen na lokalitetu KRK. Međutim, u ljeto je na lokalitetu KRK izmjerena koncentracija bila 92 puta veća od granične vrijednosti za dobro ekološko stanje. Granične vrijednosti za vrlo dobro stanje za amonijak na lokalitetu KRK su premašene i u 2020. godini (Medić i sur. 2022). Povišene vrijednosti amonijaka u površinskim vodama upućuju na prisutnost otpadnih voda, što je očekivano jer se tu nalaze ispusti komunalne vode grada Knina.

Ciklus fosfora se odvija vrlo sporo i ne uključuje atmosferu. Najviše se fosfora nalazi u sedimentu u obliku željezovih i kalcijevih fosfata, dok se mala količina nalazi otopljena u vodi. Izvori fosfata u vodama mogu biti prirodnog ili antropogenog podrijetla. Prirodno ulaze ispiranjem stijena, dok antropogeni izvori uključuju ispuštanje otpadne vode i ispiranje gnojiva iz okolnih poljoprivrednih površina. Autotrofni organizmi asimiliraju fosfor u obliku ortofosfata te ga ugrađuju u organske spojeve poput nukleinskih kiselina. Hranidbenim lancima fosfor se prenosi od primarnih producenata do potrošača i na kraju do razlagača. Razgradnjom uginulih organizama, dio fosfora se vraća u ciklus kruženja, a dio se taloži u sedimentu i više nije iskoristiv (Boyd 2000). Ukupne vrijednosti fosfora prelaze granične vrijednosti prema NN 96/2019 i NN 26/2020 na lokalitetima KRK i IWW što je posljedica ispuštanja otpadnih voda. Povećane koncentracije fosfora pogoduju rastu makrofita i fitoplanktona što može rezultirati eutrofikacijom (NN 96/2019; NN 26/2020).

Povećane koncentracije hranjivih tvari na lokalitetima TOR i KRK te značajno povećanje na lokalitetu IWW ukazuje na organsko onečišćenje nastalo kao rezultat ispuštanja komunalnih i industrijskih otpadnih voda grada Knina i tvornice vijaka. Koncentracije svih hranjivih tvari na lokalitetu TBU bile su unutar graničnih vrijednosti za dobro i vrlo dobro ekološko stanje, iako je tok Butišnice pod utjecajem intenzivne poljoprivrede. To može ukazivati na razumno korištenje gnojiva od strane poljoprivrednika te na mogući prirodni potencijal samopročišćavanja rijeke (Cukrov i sur. 2008; Lozić i sur. 2014).

6.2. Toksičnost otpadnih voda obzirom na inhibiciju rasta algi

Kako bi dobili bolji uvid u potencijalni antropogeni utjecaj na ekosustav, uz analizu fizikalno-kemijskih čimbenika proveli smo i test toksičnosti na zelenoj algi *P. subcapitata*. Ta alga ima visoku stopu rasta, visoku reproduktivnost te je visoko osjetljiva na promjene u okolišu (O'Neill i sur. 2019). Velika stimulacija rasta algi u analiziranim uzorcima može upućivati na mogućnost cvjetanja algi, odnosno na pojavu eutrofikacije i ukazuje na onečišćenje vode. Eutrofikacija uzrokuje pomanjkanje kisika, nestanak staništa i gubitak bioraznolikosti. Međutim, voda je onečišćena i ako dođe i do druge krajnosti, visoke inhibicije rasta algi. Tada isto dolazi do nestanka staništa i gubitka bioraznolikosti, jer ne postoje uvjeti za razvoj primarnih proizvođača (O'Neill i sur. 2019).

U spektroskopiji, optička gustoća predstavlja logaritamski omjer intenziteta upadne svjetlosti i svjetlosti propuštene kroz uzorak. Ona ovisi o broju i veličini čestica u uzorku. U toksikologiji se koristi kao metoda određivanja rasta odabranog organizma (alge, bakterije) u ovisnosti o zamućenosti uzorka. Ta metoda se temelji na pretpostavci da je broj stanica u bilo kojem uzorku izravno proporcionalan zamućenosti istog uzorka. Što je zamućenost uzorka veća, manje svjetlosti će prolaziti kroz medij, što će rezultirati većom vrijednosti optičke gustoće. Mjerenje optičke gustoće je široko rasprostranjena metoda u istraživanjima jer je brza i jeftina (Brown 2022).

Kao i fizikalno-kemijski čimbenici, test toksičnosti na algi *P. subcapitata* ukazao je na prisutnost najvećeg onečišćenja vode na lokalitetima KRK i IWW, odnosno tamo gdje se nalaze ispusti otpadne vode. Na uzorcima vode sa tih lokaliteta tijekom 72 sata optička gustoća je najmanje rasla, što upućuje na veću inhibiciju algi. Štoviše, pri najvećoj koncentraciji uzorka IWW došlo je do smanjenja optičke gustoće. Takve vrijednosti su rezultat inhibicije rasta algi zbog

prisutnosti previsoke koncentracije onečišćujućih tvari. Uz navedeno, test toksičnosti na algi *P. subcapitata* pokazao je najmanju toksičnost vode na lokalitetima KRS i TBU. Na uzorcima vode s tih lokaliteta, uočen je stalan rast optičke gustoće, odnosno najniža inhibicija rasta algi. Upravo su lokaliteti KRS i TBU jedini lokaliteti na kojima je na osnovi fizikalno-kemijskih čimbenika ekološko stanje vode barem u jednoj sezoni ocijenjeno kao dobro ili vrlo dobro.

Kako bi se provjerilo fiziološko stanje test organizma kao i pouzdanost i reproducibilnost test postupka, testovi se provode i s referentnom kemikalijom. U ovom diplomskom radu istraživanja su provedena s kalijevim dikromatom ($K_2Cr_2O_7$) kao referentnom tvari, a dobivene EC_{50} vrijednosti za slatkovodnu algu *P. subcapitata* kretale su se od $0,70 \text{ mg L}^{-1}$ do $0,74 \text{ mg L}^{-1}$ što je u skladu s vrijednostima koje zahtijeva ISO norma (ISO 8692 2012).

Osjetljivost testa toksičnosti se vidi analizom pojedinih sezona. Na osnovi fizikalno-kemijskih čimbenika ekološko stanje voda na lokalitetima TOR, TBU i KRK u proljeće i ljeto je ocijenjeno kao umjereno. Međutim, test toksičnost na algi *P. subcapitata* je pokazao da je voda na lokalitetu KRK ipak nešto više onečišćena, odnosno toksičnija od vode na druga dva lokaliteta. Također, test toksičnosti na algi pokazuje da je i u jesen voda na lokalitetu KRK bila toksičnija od vode na lokalitetu TOR, iako su obje umjerenog ekološkog stanja s obzirom na fizikalno-kemijske čimbenike. S druge strane, test toksičnosti na algi je pokazao da je voda na lokalitetu IWW tijekom sve tri sezone mjerenja bila najmanje toksična u ljeto, iako je tada najviše fizikalno-kemijskih čimbenika prelazilo granične vrijednosti prema Pravilniku NN 26/2020. Poredamo li analizirane uzorke od onih koji ne pokazuju toksičnost do najviše toksičnih za algu *P. subcapitata* tada je poredak slijedeći: $KRS = TBU < TOR < KRK < IWW$.

7. Zaključak

Kako rijeka Krka teče krškim područjem, onečišćenje vode samo na jednoj lokaciji može imati negativan utjecaj na područja nekoliko kilometara nizvodno.

Fizikalno-kemijski čimbenici izmjereni na pet lokaliteta rijeke Krke ukazuju na pogoršanje kakvoće vode od izvora nizvodno prema Nacionalnom parku Krka. Potvrđena je najlošija kakvoća vode nizvodno od ulijevanja industrijskih voda tvornice vijaka i komunalnih voda grada Knina. Prema graničnim vrijednostima fizikalno-kemijskih čimbenika definiranih u Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 73/2013) i Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020), voda na izvoru rijeke Krke je najboljeg ekološkog stanja, odnosno vrlo dobrog i dobrog ekološkog stanja ovisno o sezoni. Suprotno tome, voda kod grada Knina i u lagunama s industrijskom vodom je ispod kategorije dobrog ekološkog stanja i kao takva predstavlja potencijalnu opasnost za cjelokupni ekosustav rijeke Krke.

Provedeni testovi toksičnosti su potvrdili algu *Pseudokirchneriella subcapitata* kao osjetljiv bioindikator. Rezultati su ukazali na potencijalni toksični utjecaj industrijskih i komunalnih voda na rijeku Krku i važnost pravilnog pročišćavanja prije njihova ispuštanja u okoliš.

Sve navedeno ukazuje na postojeći antropogeni utjecaj na vode rijeke Krke kod grada Knina. Kako ne bi došlo do ozbiljnog onečišćenja vodotoka i tla u budućnosti, potrebno je provoditi sustavni monitoring stanja vode. Također, potrebno je sanirati lagune s ispustima industrijske vode iz tvornice kako bi se spriječila potencijalna ekološka katastrofa prouzročena izlivanjem vode iz laguna u rijeku Orašnicu i rijeku Krku tijekom jakih kiša.

Literatura

- Algaltoxkit FTM (1996): Freshwater toxicity test with microalgae. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium.
- Baird, R. B., Eaton, A. D., Rice, E. W. (2017): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Barešić J. (2009): Primjena izotopnih i geokemijskih metoda u praćenju globalnih i lokalnih promjena u ekološkom sustavu Plitvičkih jezera. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.
- Blažević, D. (2020): *Pročistač kninske Tvornice DIV-TVİK spreman za priključenje na sustav javne odvodnje, Orašnica i Krka napokon će biti zaštićene od zagađenja*. Šibenski. <https://sibenski.slobodnadalmacija.hr/sibenik/vijesti/zupanja/procistac-kninske-tvornice-div-tvik-spreman-za-prikljucenje-na-sustav-javne-odvodnje-orasnica-i-krka-napokon-ce-bitizasticene-od-zagadnja-644618> (pristupljeno 26. 8. 2022.).
- Blažević, D. (2022): *Kninske muke s državom, koja grad ima pod "posebnom skrbi": Platili pročistač otpadnih voda 10 milijuna eura, uređaj tone u močvarnom tlu, a nositelj projekta Hrvatske vode-šuti!*. TRIS portal. <https://tris.com.hr/2022/03/kninske-muke-s-drzavom-koja-grad-ima-pod-posebno-skrbi-platili-procistac-otpadnih-voda-10-milijuna-eura-uredaj-tone-u-mocvarnom-tlu-a-nositelj-projekta-hrvatske-vode-suti/> (pristupljeno 17. 8. 2022.).
- Bonacci, O. (1985): Hydrological investigations of Dinaric karst at the Krčić catchment and the river Krka springs (Yugoslavia). *Journal of Hydrology*. 82(3–4): 317–326.
- Bonacci, O. (2016): Hidrološka analiza pojave mutnoće na izvorima u kršu: interpretacija podataka mjerenih na izvoru Omble. *Stručni prikaz. Hrvatske vode*. 24: 47–57.
- Boyd., C. E. (2000): *Water quality: an introduction*. Springer Science+Business Media. New York.
- Brown, H. L. (2022): Microbial Growth. U: Rezaei, N. (ur.) *Encyclopedia of Infection and Immunity*, Elsevier, str. 324–335.
- Connell, D. W., Lam, P., Richardson, B., Wu, R. (2009): *The Ecotoxicology Concept: An Introduction*. U: *Introduction to ecotoxicology*. John Wiley & Sons, str. 1–18.

- Cukrov, N., Cmuk, P., Mlakar, M., Omanović, D. (2008): Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: an example of the self-purification. *Chemosphere* 72(10): 1559–1566.
- Davis, M. L. (2020): *Water and Wastewater Engineering: Design Principles and Practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Education.
- DeZuane, J. (1997): *Handbook of drinking water quality*. John Wiley & Sons.
- DLS d.o.o. (2018a): Plan gospodarenja otpadom grada Knina za razdoblje od 2018. do 2022. godine.
- DLS d.o.o. (2018b): Stručna podloga zahtjeva za izdavanje okolišne dozvole (REV 1), ne tehnički sažetak. Naručitelj: DIV d.o.o., tvornica vijaka, Podružnica Knin, IV gardijske brigade 44, Knin.
- Dodds, W. K., Whiles, M. R. (2020): *Freshwater Ecology: Concepts and environmental applications (Third Edition)*. Academic Press. An Elsevier Science Imprint.
- Domingues, R. B., Barbosa, A. B., Sommer, U., Galvao, H. M. (2011): Ammonium, nitrate and phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural eutrophication. *Aquatic sciences* 73(3): 331–343.
- Filipović Marijić, V., Kapetanović, D., Dragun, Z., Valić, D., Krasnići, N., Redžović, Z., Grgić, I., Žunić, J., Kružlicová, D., Nemeček, P., Ivanković, D., Vardić Smrzlić, I., Erk, M. (2018): Influence of technological and municipal wastewaters on vulnerable karst riverine system, Krka River in Croatia. *Environmental Science and Pollution Research* 25(5): 4715–4727.
- Friganović, M. (1961): Polja gornje Krke. *Acta Geographica Croatica* 3(1): 8–164.
- Herb, W. R., Janke, B., Mohseni, O., Stefan, H. G. (2008): Thermal pollution of streams by runoff from paved surfaces. *Hydrological Processes: An International Journal* 22(7): 987–999.
- Hina (2019): *Na rijekama Krki i Orašnici zbog onečišćenja proglašen I. stupanj ugroženosti voda*. Jutarnji list. <https://www.jutarnji.hr/vijesti/hrvatska/na-rijekama-krki-i-orasnici-zbog-oneciscenja-proglasen-1-stupanj-ugrozenosti-voda-8717561> (pristupljeno 16. 8. 2022.).
- Hrvatske vode (2021): Plan upravljanja vodnim područjima 2016. – 2021. Izvadak iz Registra vodnih tijela, Hrvatske vode, Zagreb.
- Hrvatske vode (2022): Plan upravljanja vodnim područjima 2022. – 2027. – Nacrt, Zagreb.

- ISO 8692 (2012): Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO: Geneva.
- Izvješće o stanju okoliša Šibensko-kninske županije (2019): Zavod za prostorno uređenje Šibensko-kninske županije.
- Kisić, I., Zgorelec, Ž., Galić, M., Delač, D. (2019): Analiza mulja i vode u lagunama onečišćenim otpadnim tvarima u Kninu. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za opću proizvodnju bilja.
- Knight A. (2008): Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing. ALTEX 25(3):213–31.
- Korfali, S. I., Davies, B. E. (2005): Seasonal variations of trace metal chemical forms in bed sediments of a karstic river in Lebanon: implications for self-purification. Environmental Geochemistry and Health 27(5): 385–395.
- Lozić, S., Gambiroža, I., Radoš, D. (2014): Prirodno-geografske pretpostavke turističke valorizacije i antropogeni utjecaj na krajobraz porječja gornje Krke. U: Drešković, N. (ur.), Zbornik radova 3. kongresa geografa Bosne i Hercegovine, Geografsko društvo u Federaciji Bosne i Hercegovine, Sarajevo, str. 376–395.
- Lukač Reberski, J., Kapelj, S., Terzić, J. (2009): An estimation of groundwater type and origin of the complex karst catchment using hydrological and hydrogeochemical parameters: A case study of the Gacka river springs. Geologia Croatica.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R. (2006): Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. Ecotoxicology and Environmental Safety 63(3): 456–462.
- Marguš, D. (2007): Problemi i prioriteti zaštite prirodne baštine Nacionalnog parka Krka. U: Marguš D.(ur.) Simpozij Rijeka Krka i Nacionalni park Krka, prirodna i kulturna baština, zaštita i održivi razvitak: zbornik radova, Javna ustanova Nacionalni park Krka, Šibenik, 1099–1115.
- Matoničkin Kepčija R. (2003): Program GLOBE- Priručnik za mjerenja. Istraživanje vode.
- Medić, Đ., Musić, V., Šikoronja, M., Tomas, D., Varat, M. (2022): Izvješće o stanju površinskih voda u 2020. godini. Hrvatske vode.

- Musić, V., Šikoronja, M., Tomas, D., Varat, M. (2020): Izvješće o stanju površinskih voda u 2019. godini. Hrvatske vode.
- Nacionalni park Krka (2021): <https://nepoznata-krka.eu/isplaniraj-moj-posjet/prirodna-bastina/kako-je-sve-pocelo-reljef/> (pristupljeno 15. 8. 2022.).
- Nacionalni park Krka (2022): <https://www.npkrka.hr/hr/prirodna-bastina/> (pristupljeno 15. 8. 2022.).
- Neal, C., House, W. A., Down, K. (1998): An assessment of excess carbon dioxide partial pressures in natural waters based on pH and alkalinity measurements. *Science of the Total Environment* 210: 173–185.
- NN 70/2005 (2005): Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine, 70/2005.
- NN 3/2017 (2017): Odluka o donošenju Plana gospodarenja otpadom Republike Hrvatske za razdoblje 2017. – 2022. godine. Narodne novine, 3/2017.
- NN 66/2019 (2019): Zakon o vodama. Narodne novine, 16/2019.
- NN 96/2019 (2019): Uredba o standardu kakvoće voda. Narodne novine, 96/2019.
- NN 26/2020 (2020): Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne novine, 26/2020.
- OIKON (2019): Strateška studija o utjecaju na okoliš Izmjena i dopuna (III) Prostornog plana uređenja Grada Knina.
- O'Neill, E. A., Rowan, N. J., Fogarty, A. M. (2019): Novel use of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, as an early-warning indicator to identify climate change ambiguity in aquatic environments using freshwater finfish farming as a case study. *Science of the Total Environment* 692: 209–218.
- Perica, D., Orešić, D., Trajbar, S. (2005): Geomorfološka obilježja doline i poriječja rijeke Krke s osvrtom na dio od Knina do Bilušića buka. *Geoadria* 10(2): 131–156.
- SAG (2022): *SAG 61.81 Raphidocelis subcapitata*. The Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany. https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81 (pristupljeno 18. 8. 2022.)
- Službeno glasilo (2021): Izvješće o stanju društva za 2020. godinu. Službeno glasilo Grada Knina 12/2021.

- Suzuki, S., Yamaguchi, H., Nakajima, N., Kawachi, M. (2018): *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchmeriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Scientific reports* 8(1): 1–13.
- Tolić S. (2013): Analiza vode i tla - Projekt IPAQ PETA. Zavod za javno zdravstvo Andrija Štampar.
- Tousova, Z., Froment, J., Oswald, P., Slobodník, J., Hilscherova, K., Thomas, K. V., Tollefsen, K. E., Reid, M., Langford, K., Blaha, L. (2018): Identification of algal growth inhibitors in treated waste water using effect-directed analysis based on non-target screening techniques. *Journal of Hazardous Materials* 358: 494–502.
- Upravni odjel za zaštitu okoliša i komunalne poslove (2021): Izvješće o provedbi Plana gospodarenja otpadom na području Šibensko-kninske županije i objedinjeno izvješće jedinica lokalne samouprave za 2020. godinu.
- Viegas, C. A. (2021): Microbial bioassays in environmental toxicity testing. *Advances in Applied Microbiology* 115: 115–158.
- Weber-Scannell, P. K., Duffy, L. K. (2007): Effects of total dissolved solids on aquatic organism: a review of literature and recommendation for salmonid species. In *American Journal of Environmental Sciences* 3: 1–6.

Životopis

Odrasla sam u Križevcima, gdje sam pohađala Osnovnu školu “Vladimir Nazor“ Križevci i Gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkog, prirodoslovno-matematički smjer. Fakultetsko obrazovanje sam započela 2017. godine, upisom Preddiplomskog studija znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija sam sudjelovala u manifestaciji „Noć biologije“ u sklopu Sekcije za edukaciju i jedno sam ljeto provela volontirajući u Morskom obrazovnom centru Pula. U rujnu 2020. godine, na istom fakultetu, upisala sam Diplomski studij znanosti o okolišu. Iste godine sam volontirala u udruzi Bioteka, u pripremi i provedbi edukativnog projekta „Biotekini terenski istraživači“. Kao članica Udruge studenata biologije – BIUS, sa Sekcijom za kopnene vode sam sudjelovala na istraživačko-edukacijskim projektima „Dabar i voda 2021“, „Žumberak 2020“ i „Žumberak 2021.“ Na Šestom simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB6) u Zagrebu, s kolegicama sam izlagala poster „Makrozoobentos i kakvoća vode lokvi Parka prirode Žumberak-Samoborsko gorje“. Sudjelovala sam u organizaciji Simpozija studenata bioloških usmjerenja 2022. godine, kao članica Tima za administraciju i financije. U okviru diplomskog studija odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Vlatke Filipović Marijić, kada sam i započela s provedbom istraživanja za diplomski rad. Tijekom studija sam obavljala studentske poslove koji su uključivali izradu edukativnog sadržaja za *on-line* platforme i administrativni rad u Upravi za zaštitu prirode.