Antonija Jančec

Mentor: Žaklin Lukša

zaklinluksa@gmail.com

ODREĐIVANJE KVALITETE VODA RUKAVACA MURE I DRAVE PRIMJENOM VODENE LEĆE KAO BIOINDIAKTORA

Čakovec

14. ožujka 2014.

Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec

V. Nazora 34, 40 000 Čakovec

Sažetak

Cilj ovog istraživanja je utvrditi razlike u kvaliteti vode rukavaca Mure i Drave uz pomoć vodene leće (*Lemnaminor* L.) kao bioindikatora. Ispitivana je voda s četiri lokacije rijeke Mure i četiri rijeke Drave uz kontrolu u vodovodnoj vodi i vodi s dodatkom optimalne količine hranjivih tvari. Praćene su morfološke promjene, prirast po masi, po broju članaka te je spektrofotometrijski određivan sadržaj pigmenata (klorofila a, klorofila b i karotenoida) te provedena terenska analiza uzoraka vode na svih osam lokacija. Pretpostavka je da će rezultati ukazati na razlike u kvaliteti površinske vode rukavaca Mure i Drave. Primjena vodene lećekao bioindikatorskog organizma pokazala je razlike u morfološkim promjenama tijekom ispitnog razdobljaovisno o uzorcima površinske vode rijeka Mure i Drave te o kontrolnim uzorcima na kojima je uzgajana. Utvrđeno je postojanje razlika između uzoraka vodene leće u prirastu po masi, po broju članaka i po sadržaju biljnih pigmenata ovisno o uzorcima površinske vode rijeka Mure i Drave te o kontrolnim uzorcima na kojima je uzgajana, ali ni u jednom slučaju ove se razlike nisu pokazale statistički značajnima. Razlike u kvaliteti vode mogu se povezati s blizinom naselja i drugih zagađivača, pa je slabija kvaliteta vode utvrđena kod lokacije na rijeci Muri M2 (koja se nalazi u blizini naselja), te kod lokacija na rijeci Dravi D2, D3, D4 (koje se nalaze u blizini većih urbanih središta i industrijskih zona). Vodena leća kao bioindikatorski organizam pokazala je razlike u kvaliteti površinske vode ispitivanih uzoraka s različitih lokacija rukavaca Mure i Drave, ali one ne upućuju na veća zagađenja na ispitivanim lokacijama. Iako nisu potpuni podaci analize voda mogu se barem jednim dijelom povezati s morfološkim promjenama, prirastom po masi i po broju članaka te količinom biljnih pigmenata kod vodene leće. Rezultati biomonitoringa mogu bi poslužiti kao indikator za daljnje analize i provođenje postupaka zaštite voda uz dopunska mjerenja i veći broj replika.

Sadržaj

1. Uvod 5
1.1. Ciljevi istraživanja ……..... 6
1.2. Hipoteze istraživanja..... 6
2. Mjerenja 7
2.1. Izbor lokacija i prikupljanje uzoraka površinske vode rijeka Mure i Drave..... 7
2.2. Kemijska analiza uzoraka površinske vode rijeka Mure i Drave…..... 8
2.3. Priprema i uzgoj vodene leće (*Lemna minor* L.) na različitim uzorcima površinskih voda rijeka Mure i Drave 8
2.4. Spektrofotometrijska analiza količine pigmenata iz uzoraka vodene leće (*Lemna minor* L.)..... 9
2.5. Statistička analiza podataka..... 10
3. Rezultati..... 11
3.1. Morfološke promjene na uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.)..... 11
3.2. Prirast vodene leće (*Lemna minor* L.) po masi..... 11
3.3. Prirast vodene leće (*Lemna minor* L.) po broju članak..... 12
3.4. Sadržaj klorofila a u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.) 13
3.5. Sadržaj klorofila b u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.) 14
3.6. Sadržaj karotenoida u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.) 14
3.7. Rezultati fizikalno-kemijske analize uzoraka površinskih voda..... 15
4. Rasprava 16
5. Zaključak 18
Zahvale 19
Popis literature 20
Dodatak 1 22
Dodatak 2 23
Dodatak 3 24
Dodatak 4 25
Dodatak 5 26
Dodatak 6 27

1. Uvod

Rastući ekološki problem u gradovima diljem svijeta jest utjecaj onečišćenja iz gradskih i industrijskih otpadnih voda na okoliš. Urbana industrijska i agrikulturalna središta uzrok su brojnih zagađenja površinskih voda i sedimenata, a kao posljedica zagađenja vode proizlazi ozbiljan problem za zdravlje ljudi koji su u interakciji s kontamiranim vodenim ekosustavima: [12].

Onečišćenje vode podrazumijeva smanjenje kvalitete vode zbog naknadno primljenih primjesa: [18]. Pod onečišćenjem u užem smislu misli se na degradaciju kvalitete vode fizičkim, kemijskim, biološkim ili radiološkim onečišćenjem do stupnja pri kojem je nemoguće korištenje vode za piće, odnosno pri kojemu voda postaje štetna za ljudsko zdravlje (Mayer, 1980). Ekološko stanje površinskih voda ocjenjuje se u odnosu na biološke, hidromorfološke i osnovne fizikalno–kemijske i kemijske elemente koji prate biološke elemente. Prema navedenim kriterijima površinske vode razvrstavaju se u kategorije ekološkog stanja: vrlo dobro ekološko stanje; dobro ekološko stanje; umjereno ekološko stanje; loše ekološko stanje; vrlo loše ekološko stanje: [16]. Kopnene vode se prema stupnju zagađenosti mogu razvrstati u četiri kategorije:

- prva kategorija obuhvaća kopnene vode koje imaju sve odlike bistre tekuće vode;
- u drugoj su kategoriji one koje su zagađene do neke podnošljive granice otpadnim vodama gradova i industrije, nisu bistre, ali su još prozirne, a život vodene flore i faune nije ozbiljno ugrožen;
- u trećoj su kategoriji mutne, prljave rijeke s najrazličitijim neugodnim mirisima, sa smanjenom količinom kisika i s opasnošću za život određenih biljnih i životinjskih vrsta;
- četvrtoj kategoriji pripadaju smrdljivi, gusti kanali otpadne vode, puni primjesa opasnih za život svih vodenih organizama: [13].

Rijeka Drava koristi se u hidroenergetici, industriji i poljoprivredi Austrije, Slovenije, Hrvatske i Mađarske. Umjereno je zagađena, a velika sanacija postignuta je izgradnjom uređaja za čišćenje u austrijskom gradu Klagenfurtu. Međutim, nizvodno se stanje pogoršava zbog zagađenja otpadnim vodama Maribora i Varaždina: [13]. Daljnjem onečišćenju Drave doprinosi rijeka Mura, čija voda u cijelom toku kvalitetom pripada četvrtoj kategoriji. Mura već iz Austrije dolazi zagađena i zadržava loše odlike do ušća u Dravu. Nakon ušća Mure

stupanj zagađenosti Drave povećava se kod Barcsa, Donjeg Miholjca, Pečuha, Belišća i Osijeka: [13].

Zbog ogromnog broja potencijalnih zagađivača vode sadržanih u našem okruženju, samo analiza vode fizikalno - kemijskim putem nedovoljna je pri određivanju stvarnog ekotoksikološkog stanja vodenog ekosustava jer je nemoguće predvidjeti fito-, cito- i genotoksična djelovanja utvrđene koncentracije kontaminirajućih supstanci na živi organizam. Stoga je pri određivanju stanja nekog vodenog ekosustava osim analize fizikalno – kemijskih svojstva vode potrebno ispitati djelovanje vode na biljni testni organizam na kojem će direktno biti vidljive promjene izazvane kemijskim sastavom vode: [21]. Korištenje vodenih testnih organizama relativno je nova metoda: [3]. Bioindikatorski organizmi posebno su važni zbog sve većeg broja mogućih zagađivača koje je teško i skupo dokazivati kemijskim analizama: [20].

U istraživanjima stanja vodenih ekosustava kao testni organizmi koriste se vodene biljke koje su vrlo osjetljive na mnoge zagađivače okoliša, uključujući i teške metale: [7]. Pri tome je važno pratiti fito-, cito- i genotoksične promjene koje mogu nastati uslijed djelovanja zagađivača: [22]. Prema standardiziranom protokolu: [9] za ispitivanje slatkovodnih voda koristi se plutajuća jednosupnica vodena leća (*Lemnaminor* L.). Među parametrima pri procjenjivanju ekotoksikološkog stanja vode najčešće se koristi parametar rasta biljnog testnog organizma, količina biljnih pigmenata (klorofil a, klorofil b i karotenoidi) i enzimska aktivnost kao što je peroksidaza: [14]. Vodena leća (*Lemnaminor* L.) koristi se i pri analizi kvalitete vode za dokazivanje teških metala: [19]. i drugih kontaminirajućih supstanci u vodenom ekosustavu, jer vodena lećamože selektivno akumulirati kemikalije i poslužiti kod biološkog monitoringa: [2]. Zbog osjetljivosti na različite toksične tvari u malim količinama: [5] na podlozi čija pH vrijednost iznosi od 5 do 9: [17] i vegetativnog razmnožavanja te jednostavnog i brzog uzgoja vodena leća (*Lemnaminor* L.) idealni je biljni testni organizam: [20]. Budući da su rezultati Radića i suradnika: [17] biomonitoringom površinskih voda rijeke Save korištenjem biljnog testnog organizma vodene leće (*Lemna minor* L.) pokazali da se dobiveni rezultati poklapaju s rezultatima fizikalno - kemijskih ispitivanja, predlažu da se zajedno s uobičajenom analizom površinskih voda u utvrđivanje kakvoće vode uvedu i biološki materijali zbog svoje jednostavnosti, osjetljivosti i isplativosti: [17].

1.1. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u kvaliteti vode iz rukavaca rijeka Mure i Drave primjenom vodene leće (*Lemnaminor* L.) kao bioindikatora. Pri tome se za vrijeme ispitnog razdoblja kod uzgoja vodene leće (*Lemna minor* L.) prate morfološke promjene, brzina razmnožavanja, prirast po masi, prirast po broju članaka te količina biljnih pigmenata (klorofila a, klorofila b i karotenoida). Ovi su parametri praćeni u toksikološkim testovima drugih istraživanja: [17]; [14]. i pokazali su da je moguće koristiti ih u biomonitoringu. Nakon utvrđenih zagađenja moguće je provesti i dodatnu analizu voda Mure i Drave kako bi se utvrdio točan zagađivač i provele mjere zaštite. Uz korištenje vodene leće kao bioindikatora provedena je i terenska fizikalno-kemijska analiza prikupljenih uzoraka površinske vode rukavaca Mure i Drave.

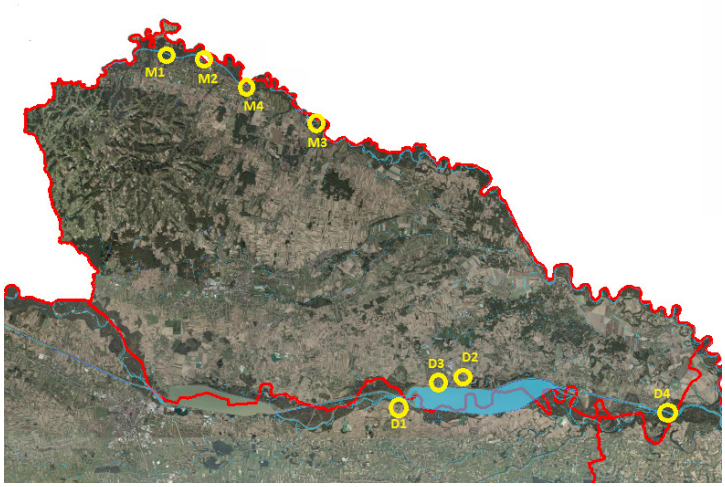
1.2. Hipoteze istraživanja

U skladu s postavljenim ciljem istraživanja hipoteze su sljedeće:

- vodena leća kao bioindikatorski organizam pokazat će razlike u kvaliteti površinske vode ispitivanih uzoraka s različitih lokacija rukavaca Mure i Drave,
- razlike u kvaliteti površinske vode mogu se povezati s blizinom naselja i drugih zagađivača pa se očekuje veće zagađenje u uzrocima površinske vode iz rukavaca rijeke Drave,
- rezultati terenske fizikalno - kemijske analize vode mogu se povezati s morfološkim promjenama, prirastom po masi i po broju članaka te količinom biljnih pigmenata kod vodene leće (*Lemnaminor* L.),
- rezultati biomonitoringa mogu poslužiti kao indikator za daljnje analize i provođenje postupaka zaštite voda.

2. Mjerenja

2.1. Izbor lokacija i prikupljanje uzoraka površinske vode rijeka Mure i Drave



Slika 1. *Satelitska snimka Međimurja s označenim lokacijama na rijekama Muri i Dravi gdje su prikupljeni uzorci površinske vode (MURA: M1 - Žabnik; M2 - Hlapićinska mrtvica; M3 - Verk; M4 - Fučićka) (DRAVA: D1 - stari tok prema Ludbregu; D2 - Prelog; D3 - Marina Prelog; D4 - Donja Dubrava)*

U istraživanju su ispitani uzorci površinskih voda prikupljeni na 8 lokacija od kojih su četiri na rukavcima rijekeMure, a četiri na rukavcima rijeke Drave. Lokacije su izabrane na način da se obuhvate različiti uvjeti koji mogu utjecati na kvalitetu vode. Svi uzorci iz rijeke Mure uzeti su iz rukavaca pri čemu su prva dva (M1, M2) uz naseljena mjesta dok je treći uzorak uz iskop pijeska i šljunka (M3), a četvrti značajnije udaljen od naselja (M4). Iz rijeke Drave prvi je uzorak iz starog toka rijeke (D1), druga dva iz akumulacijskog jezera s tim da je prvi udaljeniji od naselja i čini rukavac (D2), a drugi uz marinu Prelog (D3). Posljednji uzorak je uzet iz rukavca nakon hidroelektrane Donja Dubrava (D4).

Uzorkovanje površinskih voda rukavaca rijeke Mure provedeno je 11. listopada, a rukavaca rijeke Drave 12. listopada 2013. godine.Za kontrolu u istraživanju je korištena i voda iz vodoopskrbnog sustava Međimurskog vodovoda koja je prikupljena 12. listopada 2013. godine.Uzorci vode pune se u boce koje su 2 do 3 puta isprane vodom koja se uzrokuje. Voda se uzima otprilike 15 cm ispod površine te se pri punjenu pazi da ne uđe mulj s dna ili nečistoća s površine. Iz vodoopskrbnog sustava voda se uzima tako da se najprije 10 minuta

voda pusti istjecati, a onda se boce stave pod mlaz: [17]. Kada su boce napunjene, označene su podacima o datumu, GPS lokaciji i vremenu uzorkovanja.

2.2. Kemijska analiza uzoraka površinske vode rijeka Mure i Drave

Za analizu vode korišten je komplet za terensko testiranje vode CompactLaboratory for watertesting, Aquamerck. Prema propisanim procedurama proizvođača najprije je izmjerena temperatura uzorka vode (°C) te određena količina kisika (mg/l O_2) i pH vrijednost. Određena je karbonatna tvrdoća, ukupna tvrdoća i preostala tvrdoća. Korištenjem kolorimetrijskih metoda određene su i količine otopljenog amonijaka (mg/l NH_4^+), nitrata (mg/l NO_3^-), nitrita (mg/l NO_2^-)i fosfata (mg/l PO_4^{3-}).

2.3. Priprema i uzgoj vodene leće (*Lemna minor* L.) na različitim uzorcima površinskih voda rijeka Mure i Drave

Vodena leća (*Lemnaminor* L.) koja je u ovom istraživanju korištena kao bioindikator dobivena je s Botaničkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Uz ispitivane uzorke površinskih voda rukavaca rijeka Mure i Drave s 8 lokacija istraživanju su dodani kontrolni uzorci vodovodne vode (KV) i otopine hranjivih tvari u vodovodnoj vodi (KO). Za pripremanje otopine s hranjivim tvarima korišteno je gnojivo JBL Ferropol pri čemu je prema uputama pripremljena otopina u omjeru 0, 5 ml hranjivog gnojiva i 1 litra vodovodne vode.

U svaki posudu za nasađivanje vodene leće pripremljeno je 250 ml uzorka vode (površinske vode rukavaca, vodovodne vode ili hranjive otopine). Istraživanje je ponovljeno tri puta, u 3 istovjetne serije (replike) A, B i C. Svaka serija sastoji se od dvije kontrolne otopine (KO – otopina s hranjivom, KV – vodovodna voda), po jedan uzorak sa četiri lokacije Mure (M1, M2, M3, M4) i po jedan uzorak sa četiri lokacije Drave (D1, D2, D3, D4).

Izdvojene su po dvije jedinke vodene leće (*Lemna minor* L.) za svaki uzorak vode i prije nasađivanja su izvagane analitičkom vagom. Svi uzorci uzgajani su u kabinetu biologije pod jednakim uvjetima temperature i svjetlosti.

Od dana nasađivanja vodene leće (*Lemna minor* L.) 14. listopada 2013. do 14. studenog 2013. svaki drugi dan praćene su i bilježene morfološke promjene, boja i debljina korjenčića, obliki boja listića te je vršeno prebrojavanje jedinki. Svi podaci uneseni su u dnevnik promatranja i mjerenja. Na kraju ispitnog razdoblja analitičkom vagom ponovno je utvrđena konačna masa vodene leće (*Lemna minor* L.) u svakom uzorku i izbrojen broj članaka. Dobiveni podaci uvršteni su u sljedeće formule: [23]. za izračunavanje prirasta biljaka:

$$\Delta N = \frac{F_n - F_1}{F_1}$$

ΔN = prirast broja biljaka

F_n = broj članaka n-tog dana

F_1 = broj članaka prvog dana (1)

2.4. Spektrofotometrijska analiza količine pigmenata iz uzoraka vodene leće (*Lemna minor* L.)

Svi uzorci iz tri serije vodene leće (*Lemnaminor* L.) analizirani su metodom spektrofotometrije radi dobivanja podataka o sadržaju biljnih pigmenata (klorofila a, klorofila b te ukupnom sadržaju karotenoida).Spektrofotometrijska analiza provedena je u Bioinstitutu(Bioinstitut d.o.o. za usluge u zdravstvu i veterinarstvu, Čakovec).

Na analitičkoj vagi odvagano je 100 mg biljnog tkiva vodene leće (*Lemna minor* L.) iz svakog uzorka. Izvagani uzorcihomogenizirani su u 1,5 ml hladnom 80%-tnom acetonu u hladnom tarioniku.Nakonhomogeniziranjau hladnom tarionikuuzorci su pipetom prebačeni u označene ependorfice koje su smještene u ledu (kako bi se spriječilo brzo ishlapljivanje acetona) do centrifuge.Uzorci su centrifugirani10 minuta na temperaturi od 4°C (Q-sep™3000 QuEChERS). Nakon završetka centrifugiranjasupernatant je prelivenu nove

označene ependorfice u ledu. Nakon toga svaki je uzorak analiziran spektrofotometrom PerkinElmer model Lambda 25 tako da je izmjerena apsorbcija na valnim duljinama od470 nm, 646 nm i 663 nm.Sadržajfotosintetskih pigmenata (mg/$g_{sv.t.}$) određen je prema sljedećim formulama: [23].

Sadržaj klorofila a: $c_a = \frac{12{,}21 \cdot A_{663} - 2{,}81 \cdot A_{646}}{l \cdot 1000 \cdot m} \cdot V$ (2)

Sadržaj klorofila b: $c_b = \frac{20{,}13 \cdot A_{646} - 5{,}03 \cdot A_{663}}{l \cdot 1000 \cdot m} \cdot V$ (3)

Sadržaj ukupnih karotenoida: $c_{x+c} = \frac{(1000 \cdot A_{470} - 3{,}27 \cdot c_a - 104 \cdot c_b)/198}{l \cdot 1000 \cdot m} \cdot V$ (4)

A_X - apsorbcija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V - volumen uzorka (ml)

l - dužina optičkog puta = 1 cm

m - masa uzorka

2.5. Statistička analiza podataka

Svi rezultati u ovome radu (prikazani grafički i tablično) predstavljaju aritmetičku sredinu tri zasebne serije mjerenja (replika). Usporedba tretmana s kontrolom i pojedinih tretmana međusobno provedena je analizom varijance (one-way ANOVA) koristeći program Microsoft Excel 2010. Za utvrđivanje statističkih razlika između parova podataka korišten je t-test. Kao statistički značajni rezultati smatraju se vrijednosti različite na razini $p \leq 0{,}05$.

3. Rezultati

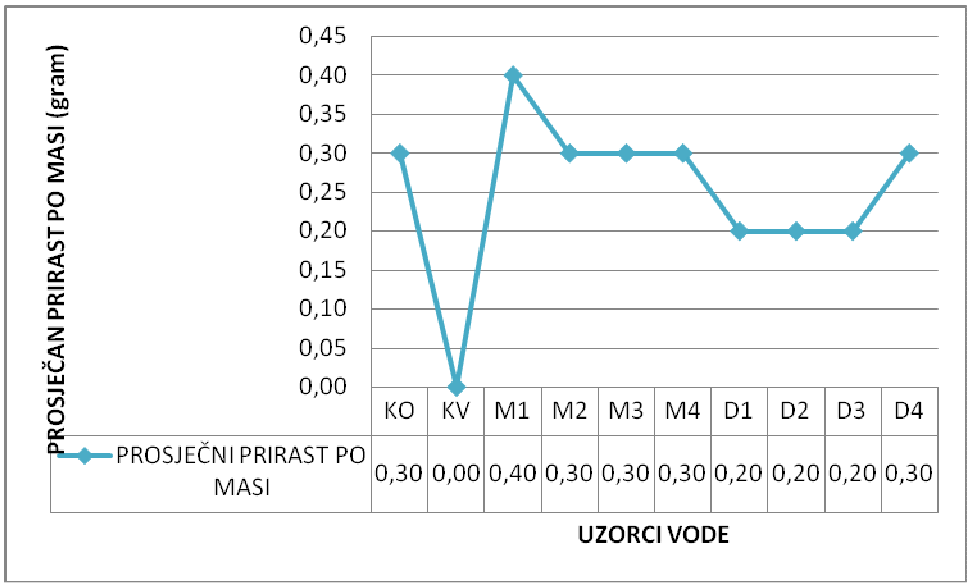
Svi rezultati predstavljaju aritmetičku sredinutri zasebne serije mjerenja (replike). Pojedinačni rezultati prikazani su u prilozima: prirast vodene leće po masi (Dodatak 1. i 2.), po broju članaka (Dodatak 3. i 4.), sadržaj biljnih pigmenata (Dodatak 5. i 6.).

3.1. Morfološke promjene na uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.)

Prve morfološke promjene na vodenoj leći uočene su 9. dana praćenja i to promijene na korjenčićima i listićima. Vodena leća uzgajana u vodi rukavaca rijeke Mure M1, M2, M3 i M4 razvija duže, deblje i tamnosmeđe korjenčiće, dok su im listići tamno zelene boje. Uzorci vodene leće uzgajani u vodi rijeke Drave D1, D2, D3 i D4 razvijaju kraće, tanje i svjetlijekorjenčiće, dok su im listići sitni svijetlo zelene boje s jasno izraženom pojavom kloroze (gubljenje biljnih pigmenata). Vodena leća uzgajana u kontrolnim uzorcima vode pokazuje vidljive promijene morfoloških osobina u vodovodnoj vodi s hranjivom KOgdje dolazi do razvoja najdužih i najdebljih korjenčića, zeleno – smeđe boje, dok su listići krupni i intenzivno zeleni. Vodenu leću uzgajanu u vodovodnoj vodi KV morfološki karakterizira „krhka“ građa s vrlo kratkim, tankim, blijedo zelenim korjenčićima i sitnim te blijedo zelenim listićima s pojavom kloroze.

3.2. Prirast vodene leće (*Lemna minor* L.) po masi

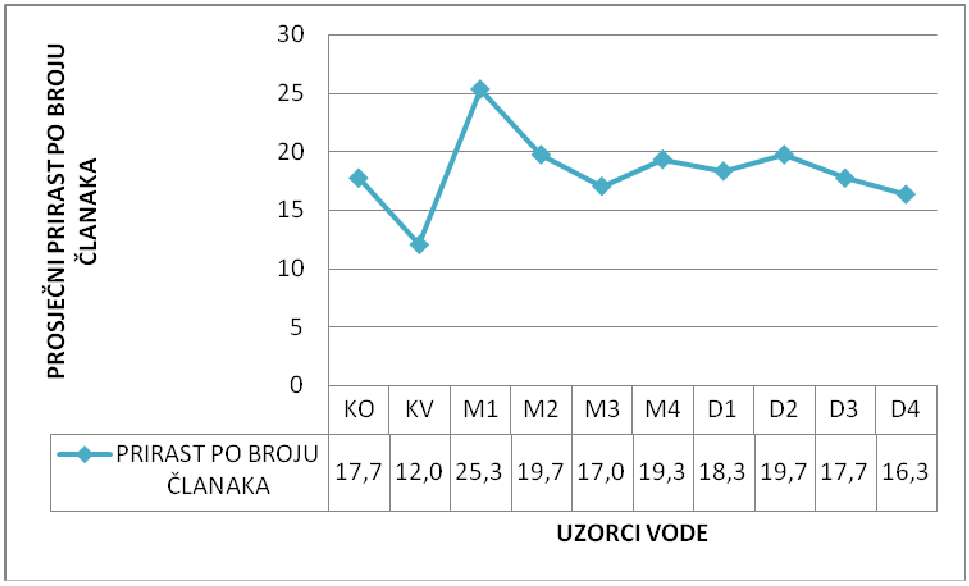
Nakon mjesec dana ispitnog razdoblja najmanji prirast po masi (0,1 gram) utvrđen je vaganjem kod vodene leće uzgajane u kontrolnom uzorku KV, a najveći prirast (0,5 grama) kod vodene leće uzgajane u uzorku površinske vode Mure M1 (Slika 2.).



Slika 2. *Prosjek prirasta vodene leće (Lemna minor L.) po masi ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure (M1,M2, M3, M4) i Drave (D1, D2, D3, D4) te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana (KO, KV)*

3.3. Prirast vodene leće (*Lemna minor* L.) po broju članak

Ukupni prirast vodene leće po broju članaka na kraju ispitnog razdoblja razlikuje se ovisno o uzorcima površinske vode rijeka Mure i Drave te o kontrolnim uzorcima na kojima je uzgajana (Slika 3.).



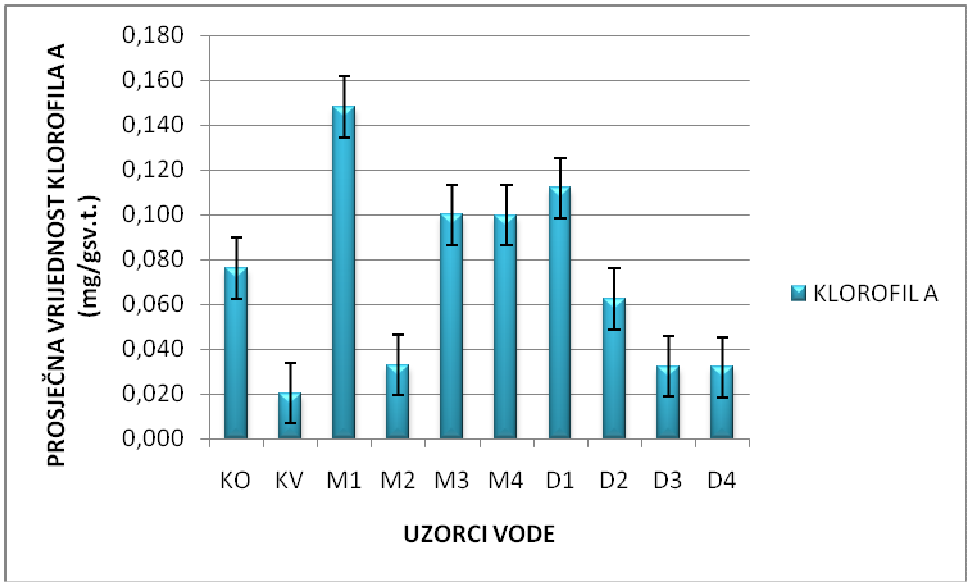
Slika 3. *Prosjek prirasta vodene leće (Lemna minor L.) po broju članaka ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure (M1,M2, M3, M4) i Drave (D1, D2, D3, D4) te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana (KO, KV)*

Najmanji prirast vodene leće po broju članaka (16,0 članaka) utvrđen je u kontrolnom uzorku KV što odgovara i rezultatima prirasta po masi. Najveći prirast vodene leće po broju članaka (29,3 članaka) utvrđen je uzorku M1 što također odgovara prirastu po masi.

Unatoč grafički vidljivim razlikama prirasta po masi i po broju članaka (slika 2. i 3.) uporabom ANOVA testa za usporedbu varijanci nije pokazala statističku znčajnost tih razlika.

3.4. Sadržaj klorofila a u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.)

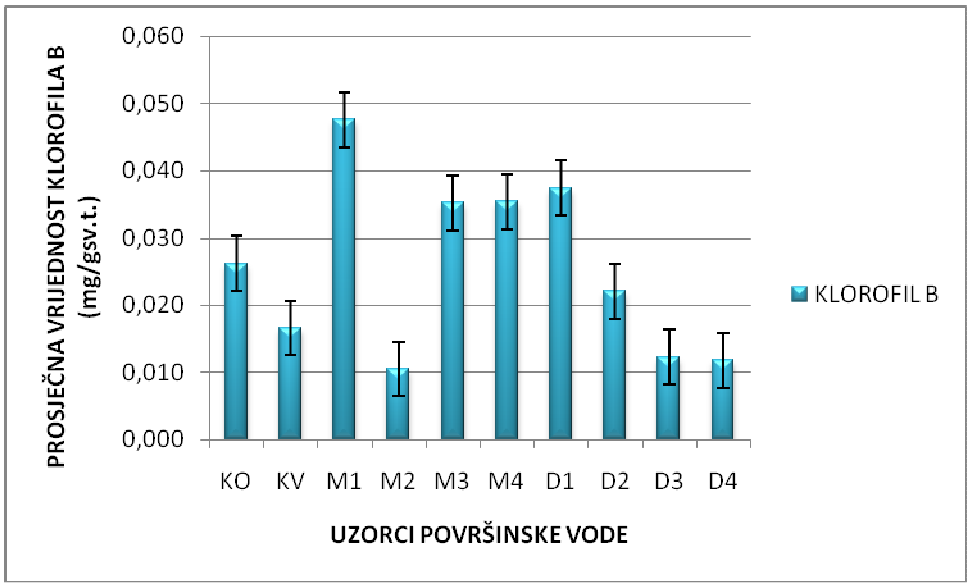
Najniži sadržaj klorofila a (0,0203 mg/$g_{sv.t.}$) utvrđen je kod vodene leće uzgajane u kontrolnom uzorku KV, a najviši (0,1480 mg/$g_{sv.t.}$) kod vodene leće uzgajane u uzorku Mure M1. Po povišenom sadržaju klorofila a ističu se još vodene leće uzgajane u uzorcima vode M3, M4 te D1 (Slika 4.).



Slika 4. *Prosječna vrijednost sadržaja klorofila a u uzorcima vodene leće (Lemna minor L.) ovisno o površinskim vodama rukavaca Mure(M1,M2, M3, M4) i Drave (D1, D2, D3, D4) te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana (KO, KV)*

3.5. Sadržaj klorofila b u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.)

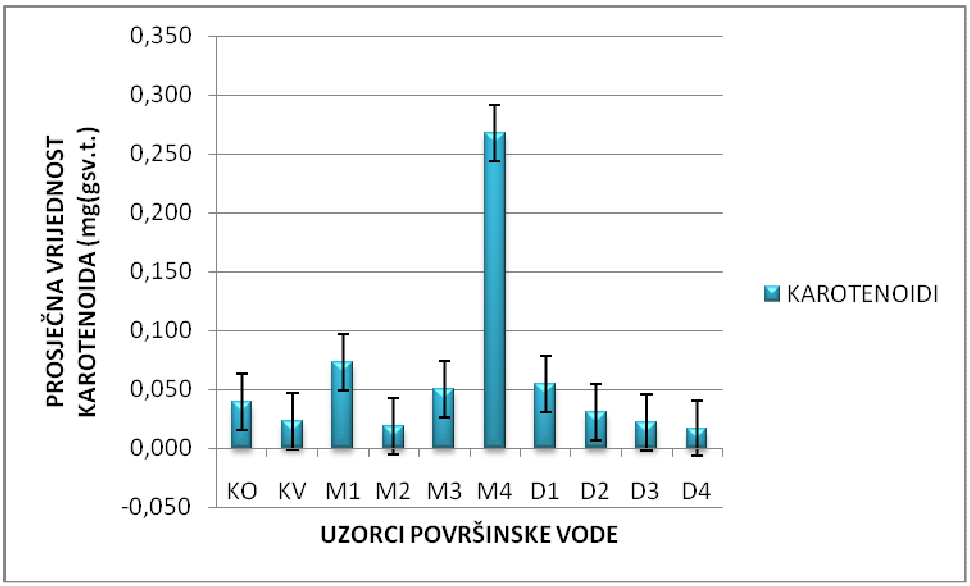
Najniži sadržaj klorofila b (0,0105 mg/$g_{sv.t.}$) utvrđen je kod vodene leće uzgajane u uzorku Mure M2, a najviši (0,0476 mg/$g_{sv.t.}$) kod vodene leće uzgajaneu uzorku Mure M1. Po povišenom sadržaju klorofila b ističu se još vodene leće uzgajane u uzorcima vode M3, M4 te D1 (Slika 5.).



Slika 5. *Prosječna vrijednost sadržaja klorofila b u uzorcima vodene leće (Lemna minor L.) ovisno o površinskim vodama rukavaca Mure(M1,M2, M3, M4) i Drave (D1, D2, D3, D4) te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana (KO, KV)*

3.6. Sadržaj karotenoida u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.)

Najniži sadržaj karotenoida (0,0186 mg/$g_{sv.t.}$) utvrđen je kod vodene leće uzgajane u uzorku Mure M2, a najviši (0,2673 mg/$g_{sv.t.}$) kod vodene leće uzgajane u uzorku MureM4. Po povišenom sadržaju karotenoida ističu se još vodene leće uzgajane u uzorcima vodeM1, M3 te D1 (Slika 6.).



Slika 6. *Prosječna vrijednost sadržaja karotenoida u uzorcima vodene leće (Lemna minor L.) ovisno o površinskim vodama rukavaca Mure(M1,M2, M3, M4) i Drave (D1, D2, D3, D4) te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana (KO, KV)*

Unatoč grafički vidljivim razlikama u sadržaju biljnih pigmenata uporabom ANOVA testa za usporedbu varijanci nema statistički značajnih razlika.

3.7. Rezultati fizikalno-kemijske analize uzoraka površinskih voda

Rezultati fizikalno – kemijske analize površinskih vode sa svih lokacija rukavaca rijeka Mure i Drave korištenjem terenskog kita iz školskog laboratorija pokazuju prema Uredbi o standardu kakvoće voda 73/13 da se radi o vrlo dobroj ili dobroj kakvoći.

Tablica 1. *Rezultati fizikalno–kemijske analize vode sa četiri lokacije rijeke Drave i četiri lokacije rijeke Mure*

	Lokacije:	D1	D2	D3	D4	M1	M2	M3	M4
Temp.	°C	13,5	12,5	12,8	13,1	12,6	13,0	13,8	13,3
pH		8,14	7,74	8,01	7,64	7,86	7,87	7,80	7,50
Kisik	mgO_2/L	11,33	6,52	11,37	8,88	18,91	11,96	10,20	9,46
Zasićenje kiskom	%	109,6	61,8	108,5	85,3	179,4	114,6	99,3	91,3
Nitrati	mgN/l	1,41	1,38	1,15	0,64	1,86	1,38	2,28	< 0,50
Nitriti	mgN/l	0,06	0,03	< 0,02	< 0,02	0,07	0,03	0,10	< 0,02
Amonijak	mgN/l	0,06	0,18	0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,20	0,03
Alkalitet	$mgCaCO_3/l$	150	150	140	210	190	240	175	250
Vodljivost	µS/cm	357	350	335	513	475	558	456	608

4. Rasprava

U pokušaju definiranja i mjerenja zagađenja na vodeni ekosustav, bioindikatorski organizmi privukli su mnogo interesa. Osnovno načelo rada bioindikatora je fiziološki i biokemijski odgovor na onečišćenje: [6].

Za usporedbu sadržaja biljnih pigmenata, prirasta po masi i prirasta po broju članaka vodene leće (*Lemna minor* L.) uzgajane u uzorcima Mure i Drave kao polazišnu točku koristili smo rezultate utvrđene kod vodene leće (*Lemna minor* L.) uzgajane u kontrolnom uzorku KO (voda s dodatkom hranjiva) jer su to prema Nagaru: [15] optimalni uvjeti za njezin razvoj.

Istraživanje je pokazalo da se zbog izloženost vodene leće (*Lemna minor* L.) različitim uzorcima površinske vode rukavaca Mure i Drave te kontrolnim uzorcima vodovodne vode i vode s dodatkom hranjiva mogu uočiti morfološke promjene na njima kao na bioindikatorskom organizmu. Na vodenim lećama (*Lemna minor* L.) uzgajanim u uzorku površinskih voda Mure nisu uočene morfološke promjene, dok su kod vodenih leća (*Lemna minor* L.) uzgajanim u uzorcima voda iz Drave kao i kod kontrolnog uzorka s vodovodnom vodom uočene promjene u razvojuvrlo kratkih, tankih, blijedo zelenih korjenčića i sitnih te blijedo zelenih listića s pojavom kloroze (gubljenje biljnih pigmenata). Ove morfološke promjene u kod leće u vodovodnoj vodi mogu biti posljedica nedostatka hranjivih tvari: [15] dok u uzorcima iz Drave to može biti posljedica onečišćenja iz vode na ispitivanim lokacijama.

U usporedbi s vrijednošću pigmenata u kontrolnom uzorku KO s optimalnom količinom hranjivih tvari utvrđen je povišen sadržaj klorofila a, klorofila b i karotenoida (Prilog 6.) u uzorcima vodene leće (*Lemna minor* L.) M1, M3, M4 i D1. Po niskom sadržaju klorofila a, klorofila b i karotenoida ističu se uzorci KV te M2, D2, D3 i D4. Najvišim sadržajem klorofila a i klorofila b ističe se uzorak M1, dok je najniži sadržaj klorofila a u KV uzorku, a klorofila b u M2 uzroku.

Rezultati najvišeg i najnižeg sadržaja karotenoida se razlikuju od sadržaja klorofila a i klorofila b te pokazuju najviši rezultat u uzorku M4, dok je najniži u uzorku M2. Prema Radić i suradnicima: [17] smanjenje sadržaja biljnih pigmenata vjerojatno nastaje kao posljedica

djelovanja toksičnosti teških metala Cu, Pb i Ni: [2]; [8] što može rezultirati i smanjenjem biomase modelne biljke iako to u našem slučaju nije moguće potvrditi za lokaciju M2.

U usporedbi s vodenom lećom (*Lemna minor* L.) uzgajanom u kontrolnom uzorku KO postoje manje razlike u prirastu po masi (Dodatak 1. i Dodatak 2.)posebice kod uzorka M1 koji pokazuje nešto veću vrijednost (0,4 g) no statistička analiza ANOVA pokazuje da ni u jednom slučaju nema statistički značajne razlike.

Rezultati prirasta vodene leće (*Lemna minor* L.) po broju članaka (Dodatak 3. i Dodatak 4.) mogu se usporediti s rezultatima prirasta po masi. Tako je najveći prirast članaka (25,3 članka) uočen kod vodene leće (*Lemna minor* L.) uzgajane u uzorku Mure M1 dok u ostalim uzorcima postoje manje razlike. Statistička analiza ANOVA pokazuje da unatoč vidljivoj razlici na prikazanim grafovima o prirastu po masi i po broju članaka nema statistički značajne razlike. Rezultati ukazuju na postojanje kontaminacije i razlike, ali to ne možemo tvrditi sa statistički potvrđenom vjerojatnošću jer nema dovoljno replika, pa bi u budućim istraživanjima trebalo voditi računa da se radi sa više serija kako bi se sa sigurnošću mogla tvrditi statistička razlika. Najniži prirast po masi i po broju članaka utvrđen je kod kontrolnog uzorka KV tj. običnoj vodovodnoj vodi. Ovi rezultati su očekivani zbog nedostatka hranjivih tvari i nisu uzeti u obzir kod računanja statističke značajnosti. Osim inhibicije rasta (manji prirast po masi i po broju članaka) te vidljive morfološke promjene kloroze koja upućuje na pad ukupnog sadržaja biljnih pigmenata (klorofila a, klorofila b i karotenoida) kod uzoraka KV, M2, D2, D3 i D4 može se smatrati posljedicom povezanosti s toksičnošću različitih onečišćujućih tvari, uključujući i metalnu toksičnost: [1].

No iako prema prikupljenim podacima terenske fizikalno – kemijske analize vode sa svih ispitivanih lokacija prema Uredbi o standardu kakvoće voda: [16]. možemo reći da su ispitivani uzorci s lokacija Mure i Drave kategorizirani kao dobri taj pšodatak nijedovoljno pouzdan. Razlog zua to je nedostatak svih parametara koji su prema navedenoj uredbi potrebni za kategorizaciju vodanpr. ukupne hranjive tvari, ukupni dušik, fosfor i sl. Stoga bi u sljedećoj fazi istraživanja trebalo provesti potpuniju analizu voda.

5. Zaključak

U skladu s dobivenim rezultatima istraživanja može se zaključiti:

- primjena vodene leće (*Lemna minor* L.) kao bioindikatorskog organizma pokazala je razlike u morfološkim promjenama tijekom ispitnog razdobljaovisno o uzorcima površinske vode rijeka Mure i Drave te o kontrolnim uzorcima na kojima je uzgajana,
- utvrđeno je postojanje razlika između uzoraka vodene leće u prirastu po masi, po broju članaka i po sadržaju biljnih pigmenata ovisno o uzorcima površinske vode rijeka Mure i Drave te o kontrolnim uzorcima na kojima je uzgajana, ali ni u jednom slučaju ove se razlike nisu pokazale statistički značajnima,
- razlike u kvaliteti vode mogu se povezati s blizinom naselja i drugih zagađivača, pa je slabija kvaliteta vode utvrđena kod lokacije na rijeci Muri M2 (koja se nalazi u blizini naselja), te kod lokacija na rijeci Dravi D2, D3, D4 (koje se nalaze u blizini većih urbanih središta i industrijskih zona),
- vodena leća kao bioindikatorski organizam pokazala je razlike u kvaliteti površinske vode ispitivanih uzoraka s različitih lokacija rukavaca Mure i Drave, ali one ne upućuju na veća zagađenja na ispitivanim lokacijama,
- iako nisu potpuni podaci analize voda mogu se barem jednim dijelom povezati s morfološkim promjenama, prirastom po masi i po broju članaka te količinom biljnih pigmenata kod vodene leće (*Lemna minor* L.),
- rezultati biomonitoringa mogu bi poslužiti kao indikator za daljnje analize i provođenje postupaka zaštite voda uz dopunska mjerenja i veći broj replika.

Zahvale

Izrada ovog rada osim mog truda i vremena tražila je i pomoć drugih osoba bez čijeg sudjelovanja ga ne bi bilo moguće izraditi. Stoga im na ovaj način svima želim zahvaliti na njihovu različitom, ali uvijek važnom doprinosu:

- djelatnicima Bioinstituta u Čakovcu koji su mi omogućili da mjerenje obavim u njihovim laboratorijima i uz mnogo povjerenja mi prepustili rad na svojoj opremi,
- dr. sc. Marija Babić s Biološkog odsjeka PMF – a u Zagrebu na uzorcima vodene leće za moje istraživanje,
- profesorici Tamari Srnec za pomoć sa statističkom obradom podataka,
- ravnateljici naše škole na moralnoj, ali i financijskoj podršci,
- svojoj mentorici na strpljenju, savjetima i konstruktivnim kritikama,
- svim profesorima koji su bili tolerantni prema mojim povremenim izostancima s nastave zbog ovog istraživanja.

Popis literature

[1] Artetxe U., García-Plazaola J.I., Hernández A., Becerril J.M. 2002. Low light grown duckweed plants are protected against the toxicity induces by Zn and Cd. Plant Physiol. Biochem. 40, 859 - 863.

[2] Axtell N. R., Sternberg S. P. K., Claussen K. 2003. Lead and nickel removal using Microspora and *Lemna minor.* Bioresource Technology 89: 41 – 48.

[3] Carbinier R. 1969. Apereu sur quelques effets de la pollution des eaux douces de la zone tempȅrȅe sur les biocȅnoses aquatiques. Bull. Sect. Georg. Minist. Educ. Nation. Paris. 80: 45–132.

[4] Čule A – M. 2013. Genotoksični učinak oborinskih voda na vodenu leću (*Lemna minor L.*), Završni rad – diplomski/integralni studij, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, str. 28.

[5] Dirilgen N. 2011. Mercury and lead: Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor.* Ecotoxicology and Environment Safety 74: 48 – 54.

[6] Fatima R.A., Ahmad M. 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewaters. Sci. Total Environ. 346, 256-273.

[7] Fiskesjȍ G. 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. Hereditas 102: 99 – 112.

[8] Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C. (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiol Biochem 45: 62 – 69.

[9] ISO/DIS 20079, 2004. Waterquality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) – Duck weed growth inhibition test.

[10] Kanoun – Boulé M., Vicente J.A.F., Nabais C., Prasad M.NV., Freitas H. (2009) Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. Aquat Toxicol 91: 1 – 9.

[11] Mayer D. 1980. Mogućnost zagađivanja vodonosnih slojeva kao posljedica hidrodinamičkih značajki na području Save u SR Hrvatskoj, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

[12] Mayer D. 2004. Ugroženost zaliha vode, Banjeglav M. (ur.), Voda – Od nastanka do uporabe. Prosvjeta, Zagreb, str. 169 – 195.

[13] Mihanović B., Perina I. 1982. Zagađenost kopnenih vodenih porječja, Herak M. (ur.), Fizikalno i kemijsko ispitivanje zagađenosti vode. Školska knjiga, Zagreb, str. 104 – 107.

[14] Mohan B. S., Hosetti B. B. 1999. Aquatic plants for toxicity Assessment. Environmental Research 81: 259 – 274.

[15] Nagar V. 2010. Supplemental UV-B radiation induced changes in growth, pigments ans antioxidant pool of bean (*Dolichos lablab*) under field conditions. Lucknow, 3 – 7

[16] Uredba o standardu kakvoće voda. 2013. Narodne novine broj: 73/2013

[17] Radić S., Stipaničev D., Cvjetko P., Marijanović Rajčić M., Širac S., Pevalek – Kozlina B., Pavlica M. 2011. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxiyity of surface waters. Exotooxicology and Environmental Safety 74: 182 – 187.

[18] Sewell H. G. 1977. Environmental Quality Menagement. Prentice – Hall Inc. VIII 311, New York

[19] Singh S., Eapan S., D´Souza SF. 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative systeminan aquatic plant, *Bacopa monnieri L.* Chemosphere; 62: 233-46.

[20] Stipaničev D. 2009. Učinak toksičnih sastojaka prirodnih i otpadnih voda na biljne testne organizme, Magistarski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, str. 91.

[21] USEPA. 1996. Ecological effects test guidelines: OPPTS 850.4400, Aquatic plant toxicity test using *Lemna* spp., Tiers I and II. Washington, DC., EPA 712-C-96-156

[22] Wang W., Freemark K. 1995. The use of plants for environmental monitoring and assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety 30: 289 – 301.

[23] Agrawal S.B., Rathore D. 2007. Changes in oxidative stress defense system in wheat (Triticum aestivum L.) and mung bean (Vigna radiata L.) cultivars grown with and without mineral nutrients and irradiated by supplemental ultraviolet-B. J Environ Exp Bot (59): 21- 33.

Dodatak 1

Dodatak 1. *Prirast vodene leće (Lemna minor* L.*) po masi ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure i Drave te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana*

SERIJA	LOKACIJE		MASA (grami)	
			Početna	Konačna
SERIJA A	Kontrola	AKO	0,1	0,4
		AKV	0,1	0,1
	Mura	AM1	0,1	0,5
		AM2	0,1	0,4
		AM3	0,1	0,4
		AM4	0,1	0,5
	Drava	AD1	0,1	0,3
		AD2	0,1	0,4
		AD3	0,1	0,3
		AD4	0,1	0,5
SERIJA B	Kontrola	BKO	0,1	0,4
		BKV	0,1	0,1
	Mura	BM1	0,1	0,4
		BM2	0,1	0,5
		BM3	0,1	0,4
		BM4	0,1	0,4
	Drava	BD1	0,1	0,5
		BD2	0,1	0,2
		BD3	0,1	0,4
		BD4	0,1	0,5
CERIJA C	Kontrola	CKO	0,1	0,4
		CKV	0,1	0,1
	Mura	CM1	0,1	0,7
		CM2	0,1	0,4
		CM3	0,1	0,4
		CM4	0,1	0,4
	Drava	CD1	0,1	0,2
		CD2	0,1	0,3
		CD3	0,1	0,3
		CD4	0,1	0,3

Dodatak 2

Dodatak 2. *Prosjek prirasta vodene leće (Lemna minor* L.*) po masi ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure i Drave te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana*

LOKACIJE		MASA (grami)	
		Početna masa	Konačna masa
Kontrola	KO	0,1	0,4
	KV	0,1	0,1
Mura	M1	0,1	0,5
	M2	0,1	0,4
	M3	0,1	0,4
	M4	0,1	0,4
Drava	D1	0,1	0,3
	D2	0,1	0,3
	D3	0,1	0,3
	D4	0,1	0,4

Dodatak 3

Dodatak 3. *Prirast vodene leće (Lemna minor* L.*) po broju članaka ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure i Drave te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana*

SERIJA	LOKACIJE		BROJ JEDINKI VODENE LEĆE (*Lemna minor L.*) PO DANIMA														
			1.	3.	5.	7.	9.	11.	13.	15.	17.	19.	21.	23.	25.	27.	29.
SERIJA A	Kontrola	AKO	4	4	4	6	8	8	9	11	14	14	16	17	18	22	22
		AKV	4	4	4	4	8	8	8	8	8	8	10	12	13	14	16
	Mura	AM1	4	4	4	5	8	8	8	11	16	16	17	20	23	27	28
		AM2	4	4	5	6	7	7	8	9	12	12	16	16	18	18	19
		AM3	4	4	8	8	8	8	9	12	16	16	16	16	17	22	24
		AM4	4	4	8	8	8	9	10	13	16	16	16	16	16	24	24
	Drava	AD1	4	4	5	7	8	8	8	10	16	16	17	19	19	24	22
		AD2	4	4	6	7	8	8	8	11	14	16	17	17	22	24	24
		AD3	4	4	4	5	6	7	8	9	11	14	15	15	17	17	21
		AD4	4	4	6	7	8	8	9	12	15	15	17	17	19	19	20
SERIJA B	Kontrola	BKO	4	4	6	8	8	8	10	12	13	16	16	19	19	23	25
		BKV	4	4	4	4	4	6	8	8	8	8	8	8	16	16	16
	Mura	BM1	4	6	6	8	11	11	12	15	17	19	23	25	29	31	38
		BM2	4	4	8	8	8	8	10	12	15	15	16	16	16	23	23
		BM3	4	4	6	8	8	8	8	10	14	15	16	16	16	21	21
		BM4	4	4	8	8	8	8	12	14	15	15	16	16	16	19	23
	Drava	BD1	4	4	6	7	8	8	11	12	12	14	16	17	19	25	25
		BD2	4	4	6	6	8	8	9	9	11	14	14	14	17	25	25
		BD3	4	4	8	9	9	9	10	11	16	17	19	19	22	24	25
		BD4	4	5	8	8	8	8	11	14	14	16	16	17	19	24	24
SERIJA C	Kontrola	CKO	4	4	4	4	6	8	8	9	9	13	12	14	16	16	18
		CKV	4	4	4	4	4	6	8	8	8	8	8	8	11	16	16
	Mura	CM1	4	4	6	8	8	8	9	13	15	16	16	16	18	22	22
		CM2	4	4	6	7	8	8	8	8	13	13	14	15	16	17	19
		CM3	4	4	4	6	6	7	8	10	10	12	12	14	16	18	18
		CM4	4	4	6	8	8	8	8	14	16	16	16	17	17	22	23
	Drava	CD1	4	4	4	4	8	8	8	8	8	10	13	14	16	20	20
		CD2	4	4	4	5	6	8	8	8	8	10	12	13	15	16	22
		CD3	4	4	5	6	8	8	8	9	11	13	14	15	15	19	19
		CD4	4	4	4	4	4	8	8	8	8	11	13	13	15	16	17

Dodatak 4

Dodatak 4. *Prosjek prirasta vodene leće (Lemna minor* L.*) po broju članaka ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure i Drave te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana*

LOKACIJE		BROJ ČLANAKA	
		Početni broj članaka	Konačni broj članaka
Kontrola	KO	4,0	21,7
	KV	4,0	16,0
Mura	M1	4,0	29,3
	M2	4,0	23,7
	M3	4,0	21,0
	M4	4,0	23,3
Drava	D1	4,0	22,3
	D2	4,0	23,7
	D3	4,0	21,7
	D4	4,0	20,3

Dodatak 5

Dodatak 5. *Valne duljine određene spektrofotometrijom*

SERIJE	LOKACIJE		VALNE DULJINE (nanometri)		
			470,00	646,00	663,00
SERIJA A	Kontrola	AKO	0,3411	0,1418	0,3126
		AKV	0,0905	0,0242	0,0369
	Mura	AM1	0,7934	0,3381	0,8102
		AM2	0,2390	0,0838	0,2078
		AM3	0,4104	0,1646	0,3807
		AM4	0,3549	0,1426	0,3493
	Drava	AD1	0,3315	0,1421	0,3362
		AD2	0,2805	0,1129	0,2731
		AD3	0,0582	0,0120	0,0203
		AD4	0,2270	0,0877	0,2214
SERIJA B	Kontrola	BKO	0,4595	0,1706	0,3957
		BKV	0,0583	0,0195	0,0265
	Mura	BM1	0,5640	0,2161	0,4873
		BM2	0,0615	0,0165	0,0390
		BM3	0,5771	0,2318	0,5140
		BM4	0,1550	0,0486	0,0992
	Drava	BD1	0,5413	0,2203	0,4994
		BD2	0,0572	0,0191	0,0038
		BD3	0,1298	0,0290	0,0502
		BD4	0,0701	0,0231	0,0393
SERIJA C	Kontrola	CKO	0,0419	-0,0010	0,0037
		CKV	0,0578	0,0166	0,0253
	Mura	CM1	0,1065	0,0136	0,0336
		CM2	0,0662	0,0252	0,0461
		CM3	0,0492	0,0146	0,0354
		CM3	0,5286	0,2293	0,4955
	Drava	CD1	0,2391	0,0859	0,2010
		CD2	0,3148	0,1390	0,2983
		CD3	0,2648	0,1032	0,2472
		CD4	0,0791	0,0336	0,0498

Dodatak 6

Dodatak 6. *Sadržaj biljnih pigmenata (klorofila a , klorofila b i karotenoida) u vodenoj leći (Lemna minor* L.*) ovisno o uzorcima površinske vode rukavaca Mure i Drave te kontrolnim uzorcima u kojima je uzgajana*

SERIJE	LOKACIJE		BILJNI PIGMENTI (mg/gsv.t.)		
			KLOROFIL A	KLOROFIL B	KAROTENOIDI
SERIJA A	Kontrola	AKO	0,1036	0,0389	0,0515
		AKV	0,0279	0,0221	0,0326
	Mura	AM1	0,2824	0,0862	0,1249
		AM2	0,0719	0,0201	0,0374
		AM3	0,1268	0,0424	0,0621
		AM4	0,1208	0,0348	0,0554
	Drava	AD1	0,1123	0,0354	0,0501
		AD2	0,0914	0,0272	0,0425
		AD3	0,0066	0,0043	0,0090
		AD4	0,0745	0,0198	0,0344
SERIJA B	Kontrola	BKO	0,1232	0,0409	0,0650
		BKV	0,0092	0,0088	0,0099
	Mura	BM1	0,1512	0,0537	0,0797
		BM2	0,0139	0,0044	0,0099
		BM3	0,1622	0,0600	0,0831
		BM4	0,0290	0,0129	0,0209
	Drava	BD1	0,1565	0,0549	0,0772
		BD2	0,0111	0,0052	0,0077
		BD3	0,0164	0,0102	0,0201
		BD4	0,0099	0,0064	0,0084
SERIJA C	Kontrola	CKO	0,0015	-0,0012	0,0024
		CKV	0,0238	0,0188	0,0256
	Mura	CM1	0,0105	0,0029	0,0152
		CM2	0,0126	0,0071	0,0085
		CM3	0,0104	0,0031	0,0065
		CM3	0,1489	0,0584	0,7257
	Drava	CD1	0,0671	0,0218	0,0362
		CD2	0,0848	0,0339	0,0409
		CD3	0,0737	0,0225	0,0358
		CD4	0,0112	0,0093	0,0086