

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marko PEZDIRC

**DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIKLORIRANIH BIFENILOV – PCB
V ČLOVEŠKI RIBICI (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela) IN V
SEDIMENTU S PODROČJA REKE KRUPA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**POLYCHLORINATED BIPHENYLS – PCB IN *Proteus anguinus*
(Amphibia: Urodela) AND SEDIMENT FROM THE REGION OF
RIVER KRUPA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelku za biologijo, Katedri za zoologijo, kjer so bili v raziskovalni skupini za morfološke in funkcionalne raziskave vretenčarjev pripravljene vzorci. Kemijska analiza vzorcev je bila narejena na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, Odseku za znanosti o okolju, v Laboratoriju za analizo kemijo okolja, in sicer v Skupini za organsko analizo kemijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Borisa Buloga in za somentorico doc. dr. Ester Heath.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alenka Gaberščik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris BULOG
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Ester HEATH
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju

Član: višja znanst. sod. dr. Zvonka JERAN
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju

Datum zagovora: 8. 9. 2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko Pezdirc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 597.98:661.723(497.4Krupa)(043.2)=163.6
- KG človeška ribica/*Proteus anguinus*/Krupa/PCB/onesnažen sediment/jetra/ledvica/skeletne mišice/prebavna cev/razporejanje PCB v tkivih/Otovec/Planinska jama/DDE
- KK
- AV PEZDIRC, Marko
- SA BULOG, Boris (mentor)/HEATH, Ester (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIKLORIRANIH BIFENILOV – PCB V ČLOVEŠKI RIBICI (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela) IN V SEDIMENTU S PODROČJA REKE KRUPE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 85 str., 20 pregl., 37 sl., 2 pril., 103 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Tovarna kondenzatorjev v Semiču je v obdobju od leta 1962 do 1983 proizvodne odpadke, kontaminirane s polikloriranimi bifenioli (PCB), odlagala v širši okolici tovarne, zato je v kraškem zaledju reke Krupe prišlo do močnega onesnaženja podzemlja s PCB. Da bi preverili posledice tega onesnaženja, smo v diplomskem delu določali vsebnost PCB v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus*) in sedimentih širšega območja reke Krupe. Za primerjavo smo izmerili koncentracije PCB v tkivih človeških ribic in sedimentih iz Otovskega brega pri Črnomlju in Planinske jame. Vzorce tkiv človeških ribic in sedimentov smo ekstrahirali s Soxhletovim aparatom ter jih po čiščenju analizirali z GC-ECD plinskim kromatografom. Rezultati so pokazali, da so PCB v tkivih človeških ribic iz izvira Krupe še vedno prisotni in sicer so njihove vsebnosti med $145 \mu\text{g g}^{-1}$ in $1291 \mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže. Vsebnost PCB v primerjavi z osebki iz Otovskega brega in Planinske jame je mnogo višja (v povprečju 155-krat višja oz. 74-krat višja). V ledvicah človeških ribic je vsebnost PCB najmanjša. V primerjavi z drugimi tkivi smo nižjo vsebnost PCB izmerili tudi v prebavni cevi. Izmerjene visoke koncentracije PCB v jetrih osebkov lahko pojasnimo s skladiščenjem lipidov v njih. Pri dveh osebkih iz izvira Krupe so bile koncentracije PCB v adipoznem tkivu višje (za 4-krat oz. 1-krat), kot v njunih skeletnih mišicah. Najvišje vsebnosti PCB smo izmerili v visceralnem maščevju in adipoznem tkivu. Primerjava vsebnosti PCB v skeletnih mišicah človeških ribic iz izvira Krupe, z izmerjeno koncentracijo PCB v skeletnih mišicah rib iz reke Krupe leta 2005, je pokazala, da so izmerjene vsebnosti PCB v človeških ribicah višje. Višja vsebnost PCB v skeletnih mišicah človeških ribic v primerjavi z ribami, je posledica življenja človeških ribic bližje virom onesnaženja oz. večje izpostavljenosti PCB ter dolgoživosti človeških ribic. Vzorec razporejanja posameznih položajnih izomer PCB (kongenersov) je pri vseh proučevanih človeških ribicah podoben, ne glede na spol, velikost in težo živali. V tkivih prevladujejo višje klorirani kongeneri. Rezultati kažejo sposobnost človeških ribic delne regulacije privzetih PCB. Izmerjene koncentracije PCB v sedimentih izvirnega dela Krupe so med 4 in $48 \mu\text{g g}^{-1}$ in so primerljive z izmerjenimi koncentracijami pred letom 1992 ter so višje kot na referenčnih mestih. Vsebnost PCB in 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic in sedimentih iz Planinske jame je višja, kot v sedimentih Otovskega brega, kar je posledica večjega prispevnega območja Planinske jame.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 597.98:661.723(497.4Krupa)(043.2)=163.6
- CX Olm/*Proteus anguinus*/Krupa/PCB/contaminated sediment/liver/kidney/skeletal muscles/digestive tract/PCB distribution in tissue/Otovec/Planinska jama/DDE
- CC
- AU PEZDIRC, Marko
- AA BULOG, Boris (mentor)/HEATH, Ester (somentor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI POLYCHLORINATED BIPHENYLS – PCB IN (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela) AND SEDIMENT FROM THE REGION OF RIVER KRUPA
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 85 p., 20 tab., 37 fig., 2 ann., 103 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB From 1962 to 1983 an electrical capacitor manufacturer in Semič dumped its waste contaminated with PCB at several locations in the region of the river Krupa and as a result the carstic hinterland of the river Krupa has become polluted with polychlorinated biphenyls (PCBs). In our research we attempt to define the concentration of PCBs in the tissues of the Olm (*Proteus anguinus*) and in river sediments. For comparison we took specimens and sediments from both Otovski breg near Črnomelj and Planinska jama. Tissue and sediment samples were extracted by Soxhlet, purified and analysed using GC-ECD. We found significant amounts of 4,4'-DDE in Olms from Otovski breg and Planinska jama. PCB concentrations in tissue samples from the Krupa spring were between 145 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 1291 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight, which is much higher when compared to Olm tissue from Otovski breg and Planinska jama (average: 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight respectively). The kidneys and digestive tract contained the lowest PCB concentration. High concentrations were found in the liver probably as a result of high lipid contents. Two animals from the Krupa spring had higher PCB concentration in adipose tissue than in their skeletal muscles. Highest concentrations of PCBs were found in visceral fat and adipose tissue. The PCBs concentrations in Olm skeletal muscles from spring Krupa were higher than those found in skeletal muscles of fish from the same river (analysed 2005). Higher PCB concentrations in Olm skeletal muscles are a consequence of living in pollution areas and their longevity (lifespan approx. 70 years). We found that the distribution of individual PCB congeners is not influenced by sex, body size or weight. More highly chlorinated PCBs were found in tissue samples. More highly chlorinated PCBs are known to metabolise slowly and concentrations can build up due to biomagnification. Our results also show how Olms have the ability to partially regulate PCB intake. The PCB concentrations in the sediment samples were between 4 and 48 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight and are comparable to measurements in the same sediments recorded in 1992 but higher than in the sediments collected at the reference sites. PCB and 4,4'-DDE concentrations in Olm tissues and sediments from Planinska jama are higher compared to samples from Otovski breg, due to the greater catchment area for waters entering Planinska jama.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ČLOVEŠKA RIBICA (<i>Proteus anguinus</i> Laurenti, 1768)	3
2.2 POLIKLORIRANI BIFENILI - PCB	5
2.2.1 Sinteza in kemijska struktura PCB	6
2.2.2 Fizikalne in kemijske lastnosti PCB	8
2.2.3 Uporaba PCB	10
2.3 VPLIV PCB NA OKOLJE IN ORGANIZME	10
2.3.1 PCB v okolju	10
2.3.2 Vnos PCB v organizme	12
2.3.3 Metabolizem PCB	13
2.3.4 Toksičnost PCB	14
2.3.5 PCB in dvoživke	16
2.4 DRUGA OBSTOJNA ORGANSKA ONESNAŽILA	18
2.5 OBMOČJE REKE KRUPE	19
2.5.1 Značilnosti	19
2.5.2 Onesnaženje	21
2.5.2.1 Voda	22
2.5.2.2 Sediment	22
2.5.2.3 Vodni organizmi	23
2.5.2.4 Dinamika onesnaženja v prihodnosti	24
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 VZORČEVALNA MESTA	26
3.2 ČLOVEŠKE RIBICE (<i>Proteus anguinus anguinus</i>)	27
3.3 SEDIMENTI	28
3.3.1 Območje reke Krupe	28
3.3.1.1 Krupa	28
3.3.1.2 Izvir ob reki Krupi	30

3.3.1.3	Lebica	31
3.3.2	Otovski breg	32
3.3.3	Planinska jama	32
3.4	PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO	33
3.4.1	Tkiva človeških ribic	34
3.4.1.1	Liofilizacija in homogenizacija	35
3.4.1.2	Ekstrakcija	35
3.4.1.3	Odstranjevanje lipidov	36
3.4.1.4	Čiščenje/frakcionacija ekstraktov	36
3.4.2	Sedimenti	37
3.4.2.1	Sušenje in homogenizacija	37
3.4.2.2	Ekstrakcija	38
3.4.2.3	Odstranjevanje žvepla	38
3.4.2.4	Čiščenje/frakcionacija ekstraktov	38
3.5	DOLOČANJE PCB IN 4,4'-DDE V VZORCIH	39
3.5.1	GC-ECD analiza	39
3.5.2	Potrditve identitete PCB in 4,4'-DDE	40
3.5.3	Linearnost analizne metode	41
3.5.4	Meje zaznavnosti in meje določljivosti	41
3.5.5	Izkoristek postopka določanja PCB	42
4	REZULTATI	43
4.1	POTRDITEV IDENTITETE PCB IN 4,4'-DDE	43
4.2	LINEARNOST ANALIZNE METODE	47
4.3	MEJE ZAZNAVNOSTI IN MEJE DOLOČLJIVOSTI	48
4.4	IZKORISTEK POSTOPKA DOLOČANJA PCB	49
4.5	VSEBNOST PCB IN 4,4'- DDE V ČLOVEŠKIH RIBICAH	51
4.6	VSEBNOST PCB IN 4,4'- DDE V SEDIMENTIH	55
5	RAZPRAVA IN SKLEP	58
5.1	RAZPRAVA	58
5.2	SKLEPI	67
6	POVZETEK	70
7	VIRI	73
7.1	CITIRANI VIRI	73
7.2	DRUGI VIRI	84
	ZAHVALA	
	Priloga A	
	Priloga B	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	8
Molekulska masa in vsebnost klora v PCB z različno stopnjo kloriranja (Sawhney, 1986: 54)	
Preglednica 2:	8
Delež zvrsti PCB v tehničnih mešanicih Aroclor 1242 in 1254 (Sawhney, 1986: 54) ter Clophen A-30 in A-50 (Polič, 2005a: 7)	
Preglednica 3:	10
Fizikalne lastnosti PCB in tehničnih mešanic Aroclor 1242 in Aroclor 1254 (Webber, 2006: 865 ; *Polič, 2005a: 11)	
Preglednica 4:	15
Toksični ekvivalenti faktorji (TEF) nekaterih PCB za ribe, ptiče in sesalce (Van der Berg in sod. 1998)	
Preglednica 5:	21
Pregled vseh količin emisij odpadnega PCB (70 t) v širšem okolju tovarne kondenzatorjev Iskra v Semiču 1962 - 1985 (Polič, 2005a: 33)	
Preglednica 6:	23
Vsebnost PCB v sedimentu izvira Krupe 1988 - 2000 (Polič, 2005a: 46)	
Preglednica 7:	24
Vsebnost sedmih PCB kongenersov (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) in njihova vsota v ribah ($\mu\text{g g}^{-1}$ jedilnega dela) iz reke Krupe v letu 2005 (prirejeno po: Posledice ... , 2005: 20)	
Preglednica 8:	27
Datum ulova in lastnosti ujetih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz izvira Krupe	
Preglednica 9:	28
Datum ulova in lastnosti ujetih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz Otovskega brega in Planinske jame	
Preglednica 10:	35
Sveža masa (g) tkiv človeških ribic (<i>Proteus anguinus</i>)	
Preglednica 11:	37
Vzorci tkiv človeških ribic	
Preglednica 12:	39
Vzorci sedimentov	
Preglednica 13:	40
Temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa GC-ECD	
Preglednica 14:	41
Temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa GC-MSD	

Preglednica 15:	48
Meja zaznavnosti instrumenta (IDL) in metode (MDL) ter meja določljivosti instrumenta (IQL) in metode (MQL) za sedem indikatorskih PCB in 4,4'-DDE v mišičnem tkivu modroplavutega tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	
Preglednica 16:	49
Meja zaznavnosti instrumenta (IDL) in metode (MDL) ter meja določljivosti instrumenta (IQL) in metode (MQL) za sedem indikatorskih PCB in 4,4'-DDE v sedimentu	
Preglednica 17:	50
Izkoristki postopka priprave vzorcev, od ekstrakcije naprej, za GC-ECD analizo	
Preglednica 18:	51
Koncentracije izbranih PCB kongenersov in njihova vsota ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz izvira reke Krupe	
Preglednica 19:	52
Koncentracije izbranih PCB kongenersov in njihova vsota ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) ter 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz Otovskega brega in Planinske jame	
Preglednica 20:	55
Koncentracije izbranih PCB kongenersov in njihova vsota ter 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v sedimentih	

KAZALO SLIK

Slika 1:	4
Razširjenost človeške ribice (prirejeno po IUCN ... , 2006)	
Slika 2:	5
Človeška ribica (<i>Proteus anguinus anguinus</i> Laurenti, 1768) (foto: A. Hodalič)	
Slika 3:	7
Splošna formula PCB	
Slika 4:	7
Primeri planarnih oz. <i>ne-orto</i> PCB kongenersov	
Slika 5:	11
Prenosi in tokovi PCB v okolju (sediment, delci - voda - zrak - organizmi) (prirejeno po Mackay, 1985: str. 93)	
Slika 6:	13
Bioakumulacija in biomagnifikacija iz severnoameriških Velikih Jezer (prirejeno po Baird 2003: 342)	
Slika 7:	17
Zarodki in paglavci s PCB ($125 \mu\text{g g}^{-1}$ tehnične mešanice Clophen A50) tretirane samice sekulje (<i>Rana temporaria</i>) (prirejeno po Gutleb in sod., 1999)	
Slika 8:	18
Pisani nektur (<i>Necturus maculosus</i> Rafinesque, 1818) (foto: E. R. Degginger)	
Slika 9:	19
Izvir reke Krupe (foto: L. Pezdirc, 2008)	
Slika 10:	20
Hidrografska skica ozemlja med Krko in Krupo (prirejeno po Habič in Kogovšek, 1992)	
Slika 11:	26
Znana odlagališča in vzorčevalna mesta v okolici reke Krupe (prirejeno po: Atlas ... , 1992; Polič, 2005a; Plut, 1987)	
Slika 12:	29
Vzorčevalni mesti ' <i>plitvina I</i> ' in ' <i>plitvina II</i> ' na oz. ob reki Krupi (prirejeno po Geopedia ... 2008)	
Slika 13:	29
Vzorčevalna mesta sedimentov na izviru reke Krupe (foto: M. Pezdirc, 2008)	
Slika 14:	30
Izvir ob reki Krupi oz. vzorčevalno mesto ' <i>potok</i> ' (foto: M. Pezdirc, 2008)	
Slika 15:	31
Vhod v Lebico (foto: L. Pezdirc, 2008)	
Slika 16:	31
Načrt jame Lebice z vzorčevalnim mestom (prirejeno po Ladišič, 2002)	

Slika 17:	32
Otovski breg z vzorčevalnim mestom (foto: M. Pezdirc, 2008)	
Slika 18:	33
Vhod v Planinsko jamo z označenim vzorčevalnim mestom ' <i>vhod Pl. jame</i> ' (prirejeno po: foto M. Rok)	
Slika 19:	44
Izsek kromatograma (GC-MSD) vzorca adipoznega tkiva osebka P188 iz izvira Krupe (<i>P188 AT</i>)	
Slika 20:	44
Izsek kromatograma (GC-MSD) standardne raztopine indikatorskih PCB (MIX21)	
Slika 21:	45
Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca adipoznega tkiva osebka P188 iz izvira Krupe (<i>P188 AT</i>)	
Slika 22:	45
Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca sedimentov iz izvira Krupe (<i>dno_L</i>)	
Slika 23:	45
Izsek iz kromatograma (GC-ECD) standardne raztopine indikatorskih PCB (MIX21)	
Slika 24:	46
Izsek kromatograma (GC-ECD) standardne raztopine tehnične mešanica Aroclor 1242	
Slika 25:	46
Izsek kromatograma (GC-ECD) standardne raztopine tehnične mešanica Aroclor 1254	
Slika 26:	46
Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca skeletnih mišic osebka P159 iz Otovskega brega (<i>P159 M</i>)	
Slika 27:	47
Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca skeletnih mišic osebka P159 iz Otovskega brega (<i>P159 M</i>) z dodatkom internega standarda za 4,4'-DDE	
Slika 28:	47
Umeritvena krivulja za PCB 153	
Slika 29:	48
Umeritvena krivulja za 4,4'-DDE	
Slika 30:	52
Koncentracija PCB ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz izvira reke Krupe	
Slika 31:	53
Koncentracije izbranih PCB kongenersov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz izvira reke Krupe	
Slika 32:	53
PCB in 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz referenčnih lokalitet	

Slika 33:	54
Koncentracije izbranih PCB kongenersov in 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) iz referenčnih lokalitet	
Slika 34:	54
Delež izbranih PCB kongenersov v vseh analiziranih tkivih človeških ribic (<i>Proteus anguinus</i>)	
Slika 35:	56
Koncentracije izbranih PCB kongenersov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v sedimentih reke Krupe	
Slika 36:	56
Koncentracije izbranih PCB kongenersov in vsebnost 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v sedimentih ostalih vzorčevalnih mest	
Slika 37:	57
Delež izbranih PCB kongenersov v sedimentih reke Krupe, vzorčevalnega mesta ' <i>potok</i> ', jame Lebice, Otovskega brega in Planinske jame	

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACTH	adenokortikotropni hormon (<u>a</u> dren <u>o</u> cortico <u>t</u> rophic <u>h</u> ormone)
DDT	dikloro-difenil-trikloroetan (<u>d</u> ichloro- <u>d</u> iphenyl- <u>t</u> richloroethane)
DDE	dikloro-difenil-dikloroeten (<u>d</u> ichloro- <u>d</u> iphenyl-dichloro <u>e</u> thylene)
EPA	ameriška vladna agencija za varstvo okolja (US <u>E</u> nvironmental <u>P</u> rotection <u>A</u> gency)
FDA	ameriški vladni urad za prehrano in zdravila (US <u>F</u> ood an <u>d</u> <u>D</u> rug <u>A</u> dm <u>i</u> nstrat <u>i</u> on)
IDL	meja zaznavnosti instrumenta (<u>I</u> nstrument <u>D</u> etect <u>i</u> on <u>L</u> imit)
IQI	meja določljivosti instrumenta (<u>I</u> nstrument <u>Q</u> uantificat <u>i</u> on <u>L</u> imit)
IUPAC	<u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>P</u> ure and <u>A</u> pp <u>l</u> ied <u>C</u> hemistry
MDL	meja zaznavnosti metode (<u>M</u> ethod <u>D</u> etect <u>i</u> on <u>L</u> imit)
SQL	meja določljivosti metode (<u>M</u> ethod <u>Q</u> uantificat <u>i</u> on <u>L</u> imit)
PAHs	policiklični aromatski ogljikovodiki (<u>p</u> olycyclic <u>a</u> romatic <u>h</u> ydrocarb <u>o</u> ns)
PCB	poliklorirani bifenili (<u>p</u> olychlorinated <u>b</u> iphenyls)
PCDDs	poliklorirani dibenzo dioksini (<u>p</u> olychlorinated <u>d</u> ibenzo <u>d</u> ioxins)
PCDFs	poliklorirani dibenzofurani (<u>p</u> olychlorinated <u>d</u> ibenzofurans)
POPs	obstojna organska onesnažila (<u>p</u> ersistent <u>o</u> rganic <u>p</u> ollutants)
PVC	polivinil klorid (<u>p</u> olyvinyl <u>c</u> hloride), tj. po IUPAC polikloroetan
TEF	toksični ekvivalentni faktor (<u>t</u> oxic <u>e</u> quivalency <u>f</u> actor)
TEQ	toksični ekvivalent (<u>t</u> oxic <u>e</u> quivalent)
TCDD	tetraklorodibenzo-p-dioksin (<u>t</u> etrachlorodibenzo- <u>p</u> - <u>d</u> ioxin)
TNT	trinitrotoulen (<u>t</u> rinitrot <u>o</u> ulene)
UNEP	Okoljski program Združenih narodov (<u>U</u> nited <u>N</u> ation <u>E</u> nvironment <u>P</u> rogram)

1 UVOD

Poliklorirani bifenili (PCB) so v zadnjih desetletjih številne teme okoljevarstvenih in analitskih študij. Po merilih Okoljskega programa Združenih narodov (UNEP) gre za toksične in obstojne organske spojine, ki se bioakumulirajo. Prave razsežnosti problema spoznamo ob podatku, da je do sredine osemdesetih let 20. stoletja v okolje ušlo okoli 30 % svetovne proizvodnje PCB (Tanabe, 1988), ki je znašala preko 1 300 000 t (Breivik in sod., 2001).

V svetu prva dognanja o PCB v naravi in živalih segajo že v šestdeseta leta prejšnjega stoletja. Neslaven rekord onesnaženja okolja žal pripada tudi tovarni kondenzatorjev v Semiču v Beli krajini, ki je od leta 1962 kot impregnacijsko olje za kondenzatorje uporabljala PCB. Zaradi dolgoletnega nepazljivega ravnanja s PCB v proizvodnji, še bolj pa neprimerne odlaganja odpadnih PCB, je prišlo do onesnaženja širšega območja belokranjskega plitvega krasa. Bela krajina je geomorfološko specifično področje, kjer se stikata dinarski visoki in belokranjski plitvi kras imenovan tudi belokranjski ravnik. Leta 1983 so odkrili onesnaženje reke Krupe. Tako je bila junija 1983 koncentracija PCB, po ameriški zakonodaji za rečno vodo (dopustna meja po EPA je bila 1 ng L^{-1}), v izviru Krupe prekoračena za 300-krat, oktobra istega leta pa za 400-krat. Kasneje so dokazali visoke koncentracije tudi v zraku, sedimentih, organizmih in drugih bioloških vzorcih. Ugotovljeno je bilo, da je bil izvir Krupe med najbolj onesnaženimi izviri na svetu in po literaturi edini vodni vir v Evropi, ki je imel tako visoko koncentracijo PCB (Plut, 1987).

Posledice onesnaženja so toliko hujše, ker se je poleg škodljivih zdravstvenih vplivov na prebivalstvo, onesnažilo tudi kraško podzemlje in s tem največji belokranjski izvir, ki je bil predviden kot vodno zajetje za regionalno oskrbo. V reki Krupi in okolici je zelo bogato endemično vodno in obvodno živalstvo in rastlinstvo. V samem podzemnem vodnem bazenu izvira Krupe pa živi endemična jamska dvoživka, človeška ribica (*Proteus anguinus*), ki je bila od začetka odlaganja PCB odpadkov zaradi dolgoživosti (okoli 70 let) izpostavljena visokim koncentracijam PCB. V podzemlju Krupe živijo tudi endemična jamska školjka (*Congeria kusceri*) in endemični jamski polži. Zato je varovanje reke in njenega zaledja pomembno tudi z vidika ohranjanja biotske pestrosti.

Vpliv PCB na podzemne organizme območja Krupe ni znano. Namen diplomskega dela je ugotoviti vsebnost akumuliranih PCB v človeških ribicah in sedimentih izvirnega dela reke in okolice. Dolgoživost človeških ribic pomeni daljšo izpostavitvev in možno prekomerno kopičenje PCB v organizmu, kar lahko resno ogrozi njihov obstoj na območju belokranjskega krasa. Izmerjene koncentracije PCB v tkivih povedo, v kolikšni meri lahko človeške ribice izločajo oz. regulirajo količino privzetih PCB. Postavljena hipoteza je, da zaradi svojega počasnega metabolizma niso sposobne regulirati privzetih PCB oz. jih le delno. Vsebnost PCB v človeških ribicah naj bi bila višja v primerjavi s koncentracijami PCB v ribah iz reke Krupe, ki so bile izmerjene v prejšnjih letih. Človeška ribica je primeren bioindikator, kljub zakonski zaščiti, saj nam njena dolgoživost in najvišje mesto v prehranjevalni verigi podzemnih ekosistemov dinarskega krasa, da vpogled v trenutno stanje onesnaženja oz. dogajanje v preteklosti.

Vzporedno smo s spremljanjem vsebnosti PCB v sedimentih ugotavljali onesnaženje oz. njegovo zmanjšanje glede na pretekla leta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ČLOVEŠKA RIBICA (*Proteus anguinus* Laurenti, 1768)

Sistematska uvrstitev:

deblo:	strunarji (Chordata)
poddeblo:	vretenčarji (Vertebrata)
razred:	dvoživke (Amphibia)
red:	repati krkoni (Urodela)
družina:	močerilarji (Proteidae)
rod in vrsta:	človeška ribica (<i>Proteus anguinus</i>)

(Sket in sod., 2003)

Človeška ribica ali močeril je edini jamski vretenčar v Evropi (Bulog, 1994). Živi v podzemeljskih vodah dinarskega krasa. Ponoči jo lahko najdemo tudi v površinskih vodah nekaterih izvirov. Areal vrste zajema majhen del severovzhodne Italije, južno Slovenijo, južno Hrvaško ter dele Bosne in Hercegovine do reke Trebišnice v vzhodni Hercegovini (Slika 1). Po sedaj znanih podatkih jo najdemo na okoli 250 lokalitetah. Ponekod so bile populacije iztrebljene oz. vsaj močno ogrožene zaradi onesnaženja ali umetnih hidrografskih sprememb (Sket, 1997). Poznani sta dve podvrsti: bolj razširjen depigmentirani beli močeril (*Proteus anguinus anguinus* Laurenti, 1768) in pigmentirana podvrsta črni močeril (*Proteus anguinus parkelj* Sket in Arntzen, 1994), ki je slovenski endemit. Najdemo ga na dveh lokacijah v Beli krajini, v izvirov reke Dobljčice in izvirov Jelševnice v vasi Jelševnik, kar predstavlja površino manjšo od 100 km² (Poboljšaj, 2003).

Odrasli osebki merijo od 25 do 30 cm, izjemoma tudi do 40 cm (Webber, 2000). Tako je človeška ribica največja jamska žival na svetu. Samec in samica se po zunanosti ne razlikujeta. Dobro je prilagojena na svoje okolje (Aljančič in sod., 1993: 7). Kaže nekatere troglomorfne lastnosti (Slika 2): podaljšanje nekaterih telesnih delov, predvsem nesorazmerna rast glave v dolžino, reducirane oči, depigmentacija kože, počasen metabolizem in sposobnost dolgega stradanja (več kot 10 let), dolga življenska doba (več kot 70 let) ter specializacija čutilnih organov (Bulog in sod., 2000). Dobro so razviti čutilni

organi oktavolateralnega sistema (mehanoreceptorni nevrovasti in notranje uho ter elektroreceptorni ampularni organi). Pomembno vlogo imajo tudi okušalni brstiči in vohalni organ (Bulog, 1994), ki naj bi bil izredno dobro razvit (Aljančič in sod., 1993: 7). Pri človeški ribici je odkrita tudi sposobnost zaznavanja zemeljskega magnetnega polja (Bulog in sod., 2002a). Poleg tega je pomemben fotosenzitivni čut (Kos in sod. 2001).



Slika 1: Razširjenost človeške ribice (prirejeno po IUCN ... , 2006)

Človeška ribica je neotenična dvoživka. Neoteniija je razvojna posebnost dvoživk, pri kateri osebki v odraslem stanju ohranijo nekatere larvalne značilnosti. Ohranijo se zunanje škrge, škržne reže, koža značilna za ličinke in visceralni skeletni elementi (Bulog, 1994).

Spolno zrelost doseže pri starosti 14 let (Bulog in sod., 2000) in šele dve leti kasneje se začnejo razmnoževati. Zrela samica verjetno izloča feromon podobno snov, ki jo samec zazna že od daleč, kar ga vzdraži, da začne s svatbenim plesom. Nekaj dni po parjenju začne samica odlagati jajca, ki jih posamič prileplja na spodnjo stran ploščatih skal. Odloži do 70 jajc, ki jih tudi varuje (Aljančič in sod., 1993). Pri 11 °C se po 120 dneh izvalijo ličinke, katerih razvoj traja okoli 110 dni (Bulog in sod., 2000).



Slika 2: Človeška ribica (*Proteus anguinus anguinus* Laurenti, 1768) (foto: A. Hodalič)

Človeška ribica pleni rake in polže. Poleti pa je prehrana dopolnjena z žuželkami, ki zaidejo v podzemlje (Bulog, 1994).

Leta 1982 je bila človeška ribica uvrščena v seznam redkih in ogroženih vrst, s katerimi je strogo prepovedano trgovati. Zavarovana je kot ranljiva vrsta (Pravilnik o uvrstitvi ... , 2002). Z vstopom v Evropsko Unijo je morala Slovenija vzpostaviti ustrezne mehanizme za zaščito vrst iz Direktive o habitatih, v katero sodi tudi varovanje in ohranjanje človeške ribice (Direktiva ... 1992). Na Hrvaškem je zaščiten po Pravilniku o zaščiti dvoživk (Pravilnik o zaščiti ... , 1999).

2.2 POLIKLORIRANI BIFENILI - PCB

Poliklorirani bifenioli ali PCB so sintetični ciklični ogljikovodiki sestavljeni iz dveh aromatskih benzenovih obročev, na katere je vezano različno število klorovih atomov (Baird, 2003). Nastajajo tudi pri gorenju organskih odpadkov z dimerizacijo klorobenzenov. Njihov delež je, v primerjavi z deležem klorobenzenov, zelo majhen (Ballschmitter in sod., 1989).

PCB spadajo med obstojna organska onesnažila (POPs), kamor sodijo tudi pesticidi, dioksini (PCDDs), furani (PCDFs), policiklični aromatski ogljikovodiki (PAHs) idr.

Skupne značilnosti obstojnih organskih onesnažil so po merilih Okoljskega programa Združenih narodov - UNEP (Eduleje, 2001: 2):

1. **obstojnost** (razpolovna doba v vodi daljša od dveh mesecev, v sedimentih in prsti pa daljša od šestih mesecev)
2. **toksičnost** (škodljivi učinki za zdravje ljudi in/ali na okolje)
3. **bioakumulacija**
4. **prenos na velike razdalje** (parni tlak nižji od 1000 Pa; razpolovna doba v atmosferi daljša od dveh dni)

Prvič so jih sintetizirali leta 1881, z industrijsko proizvodnjo pa so začeli leta 1929 v ZDA (Lovrenčič, 2001). Največ PCB so proizvedle ZDA (podjetje Monsanto - 50 % svetovne proizvodnje), Sovjetska zveza (podjetji Orgsteklo in Orgsintez), Zvezna republika Nemčija (podjetje Bayer AG) in Francija (podjetje Prodelec). Svetovna proizvodnja PCB je višek dosegla konec šestdesetih in v začetku sedemdesetih let 20. stoletja. V letih 1930 - 1993 je presegla 1 324 000 ton (Breivik in sod., 2001).

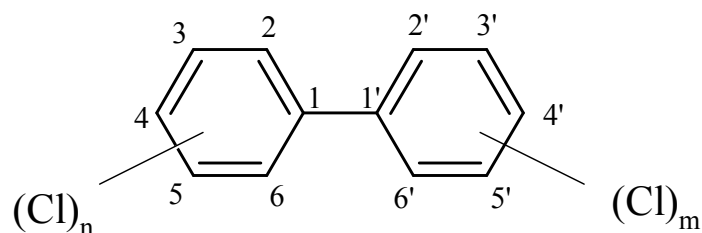
Prva dognanja o vsebnosti škodljivih PCB v naravi segajo v pozna šestdeseta leta 20. stoletja. Leta 1966 so na Švedskem, pri analizi DDT v bioloških vzorcih, odkrili tudi visoke koncentracije PCB (Jensen, 1972). V sedemdesetih letih so začeli omejevati oz. so prekinili njihovo proizvodnjo, in sicer na Japonskem leta 1972, v ZDA in Veliki Britaniji 1977, v Zvezni republiki Nemčiji 1983, v Franciji 1984 ter v Rusiji 1993 (Breivik in sod., 2001).

Tanabe (1988) domneva, da je do sredine osemdesetih let 20. stoletja v okolje prešlo okoli 30 % svetovne proizvodnje PCB. V tleh (»back ground soil«) kontinentov naj bi še vedno bilo okrog 21 000 ton PCB (Meijer in sod., 2003).

2.2.1 Sinteza in kemijska struktura PCB

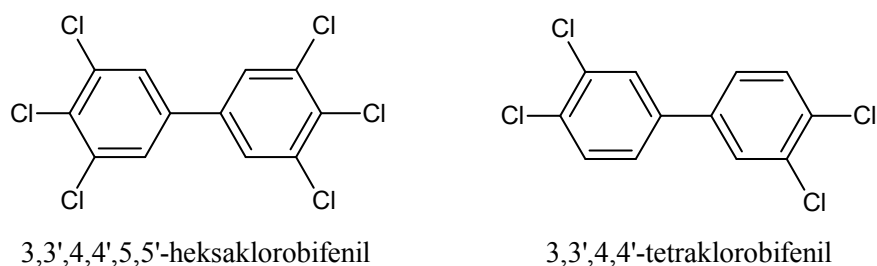
PCB sintetiziramo s kloriranjem bifenila ob prisotnosti katalizatorja železovega (III) klorida (FeCl_3). Bifenil predhodno dobimo s segrevanjem benzena pri temperaturi $750\text{ }^\circ\text{C}$ ob prisotnosti svinca (Pb) kot katalizatorja. Več kot je prisotnega klora in dlje kot poteka

kloriranje bifenila, večje je, na splošno, število vezanih klorovih atomov na bifenilne obroče (Preglednica 1). Slika 3 prikazuje splošno formulo PCB. Na oštevilčena mesta se lahko veže po en klorov atom. Vseh možnih položajnih izomer oz. zvrsti (kongenersov) glede na položaj Cl v molekuli PCB je 209 - glej Prilogo A (Baird, 2003: 337).



Slika 3: Splošna formula PCB (n in m sta števili klorovih atomov vezanih na posamezen fenilni obroč)

Nekateri PCB kongenersi imajo planarno strukturo. Zavzamejo jo, ko nimajo vezanega klora na *orto* mestih. Takrat sta bifenilna obroča v isti ravnini. Govorimo o *ne-orto* substituiranih PCB (Slika 4). Večina PCB je *orto* substituiranih in so zaradi klora vezanega na *orto* mestu neplanarni. *Orto* in *ne-orto* substituirani PCB se poleg prostorske geometrije razlikujejo tudi biokemijsko (Walker, 2001). Za *ne-orto* substituirane PCB je znano, da so najbolj toksični (Baird, 2003: 351).



Slika 4: Primera planarnih oz. *ne-orto* PCB kongenersov

Posameznih PCB kongenersov za komercialno uporabo niso izolirali, ampak so največkrat uporabljali različne tehnične mešanice izomer PCB. Stopnja kloriranja določa strukturo oz. lastnosti ter posledično uporabo mešanice. Povprečni delež klora v njih je od 21 do 68 % (Walker, 2001: 121). Tehnične mešanice poznamo pod različnimi komercialnimi imeni, npr. Aroclor[®] (proizvajalec Monsanto, ZDA), Clophen[®] (Bayer AG, Nemčija), Pyralene[®]

(Prodelec, Francija). Sestava PCB v mešanicah različnih proizvajalcev je podobna sestavi serij tehničnih mešanic Aroclor (Preglednica 2), ki jih uporabljamo kot referenčne za ostale komercialne mešanice (Cairns in sod., 1986).

Preglednica 1: Molekulska masa in vsebnost klora v PCB z različno stopnjo kloriranja (Sawhney, 1986: 54)

PCB	Molekulska masa	Vsebnost Cl v PCB (%)
Monoklorbifenil	188,65	18,79
Diklorobifenil	223,10	31,77
Triklorobifenil	257,54	41,30
Tetraklorobifenil	291,99	48,56
Pentaklorobifenil	326,43	54,30
Heksaklorobifenil	360,88	58,93
Heptaklorobifenil	395,32	62,77
Oktaklorobifenil	429,77	65,98
Nonaklorobifenil	464,21	68,73

Preglednica 2: Delež zvrsti PCB v tehničnih mešanicah Aroclor 1242 in 1254 (Sawhney, 1986: 54) ter Clophen A-30 in A-50 (Polič, 2005a: 7)

PCB	Delež zvrsti PCB (%)			
	Aroclor		Clophen	
	1242	1254	A-30	A-50
Monoklorbifenil	3	-	1	-
Diklorobifenil	13	-	9	1
Triklorobifenil	28	-	16	14
Tetraklorobifenil	30	11	18	13
Pentaklorobifenil	22	49	10	19
Heksaklorobifenil	4	34	1	22
Heptaklorobifenil	-	6	-	-

2.2.2 Fizikalne in kemijske lastnosti PCB

Posamezni PCB so pogosto v trdnem agregatnem stanju, vendar pa je večina komercialnih mešanic viskozni tekočini, ki se pri hlajenju spremenijo v smole. Visoko klorirane mešanice, kot npr. Aroclor 1260, so smole že pri sobni temperaturi (Walker, 2001: 122). Z večanjem števila klorovih atomov v molekuli raste viskoznost (Webber, 2006). Gostota PCB je med 1,340 in 1,567 kg dm⁻³ pri 20 °C (Lovrenčič, 2001).

V splošnem so PCB kemično in termično zelo stabilne spojine (Walker, 2001: 122) in odporne na hidrolitske, oksidacijske ter redukcijske procese (Sklarew in Girvin, 1987).

Topnost PCB v vodi je majhna, med $9,3 \text{ g m}^{-3}$ za bifenil in $7,6 \cdot 10^{-4} \text{ g m}^{-3}$ za dekaklorobifenil (Preglednica 3) in se zmanjšuje z višanjem števila vezanih klorovih atomov v molekuli ter je tako odvisna od molekulske mase (Sawhney, 1986). PCB so spojine z izrazito lipofilnimi lastnostmi, zato so dobro topni v hidrofobnih medijih, oljih in maščobah (Ballschmiter in sod., 1989).

Merilo za lipofilnost predstavlja porazdelitveni koeficient med oktanolom in vodo (K_{ow}), ki je podan kot razmerje ravnotežnih koncentracij v obeh fazah (Batu, 2005: 620):

$$K_{ow} = \frac{c_o}{c_w} \quad \dots (1)$$

c_o ... koncentracija spojine v n-oktanolu (g mL^{-1})

c_w ... koncentracija spojine v vodi (g mL^{-1})

Večji kot je K_{ow} , večja je lipofilnost oz. manjša je polarost (Polič, 2005a). K_{ow} pri PCB v glavnem narašča s stopnjo kloriranja (Preglednica 3), pogojuje pa jo tudi lega klorovih atomov (Sklarew in Girvin, 1987).

Zaradi slabe topnosti v vodi in velike lipofilnosti (velik K_{ow}) se PCB radi vežejo na suspendirane delce, še posebno če ti vsebujejo veliko organskega ogljika (Chou in Griffin, 1986). Na splošno se vezava PCB na delce povečuje s številom klorovih atomov v molekuli in posledično višjo hidrofobnostjo PCB (Girvin in sod. 1997).

PCB imajo zelo nizek parni tlak, ki pada, podobno kot druge lastnosti, z višanjem stopnje kloriranosti (Preglednica 3). PCB bolj prehajajo iz vode v zrak kot pa iz zemlje oz. sedimentov, saj so v njih vezani (Sawhney, 1986).

Za PCB je značilen tudi majhen električen upor (Walker, 2001: 121) oz. majhna dielektričnost (Sawhney, 1986)

Preglednica 3: Fizikalne lastnosti PCB in tehničnih mešanic Aroclor 1242 in Aroclor 1254
(Webber, 2006: 865 ; *Polič, 2005a: 11)

PCB	Topnost v vodi pri 25 °C (g m ⁻³)	log K _{ow}	Parni tlak pri 25 °C (Pa)
Bifenil	9,3	4,3	4,9
Monoklorbifenil	4,0	4,7	1,1
Diklorobifenil	1,6	5,1	0,24
Triklorobifenil	0,65	5,5	0,054
Tetraklorobifenil	0,26	5,9	0,012
Pentaklorobifenil	0,099	6,3	2,6 · 10 ⁻³
Heksaklorobifenil	0,038	6,7	5,8 · 10 ⁻⁴
Heptaklorobifenil	0,014	7,1	1,3 · 10 ⁻⁴
Oktaklorobifenil	5,5 · 10 ⁻³	7,5	2,8 · 10 ⁻⁵
Nonaklorobifenil	2,0 · 10 ⁻³	7,9	6,3 · 10 ⁻⁶
Dekaklorobifenil	7,6 · 10 ⁻⁴	8,3	1,4 · 10 ⁻⁶
Aroclor 1242	0,75	4,5-5,8	0,091
Aroclor 1254	0,14	6,1-6,8	6,7 · 10 ⁻³

2.2.3 Uporaba PCB

Zaradi poceni izdelave, zelo dobrih tehnoloških lastnosti, kot so inertnost, termostabilnost (Baird, 2003), slaba električna prevodnost (Walker, 2001: 121) oz. majhna dielektričnost (Sawhney, 1986), so PCB veliko uporabljali v proizvodnji električnih transformatorjev in kondenzatorjev (Walker, 2001: 121). Uporabljali so jih tudi kot hladilna olja, hidravlične tekočine in maziva (Cairns in sod., 1986). V proizvodnji plastičnih mas so PCB predstavljali mehčalce, ki ohranjajo materialom, npr. PVC, fleksibilnost. Pri reciklaži časopisnega papirja pa kot topila za tiskarsko črnilo (Baird, 2003: 340). Poleg omenjenega, Webber (2006) navaja še uporabo v proizvodnji barv, lepil in voskov, insekticidov ter za kontrolo prahu makadamskih cest.

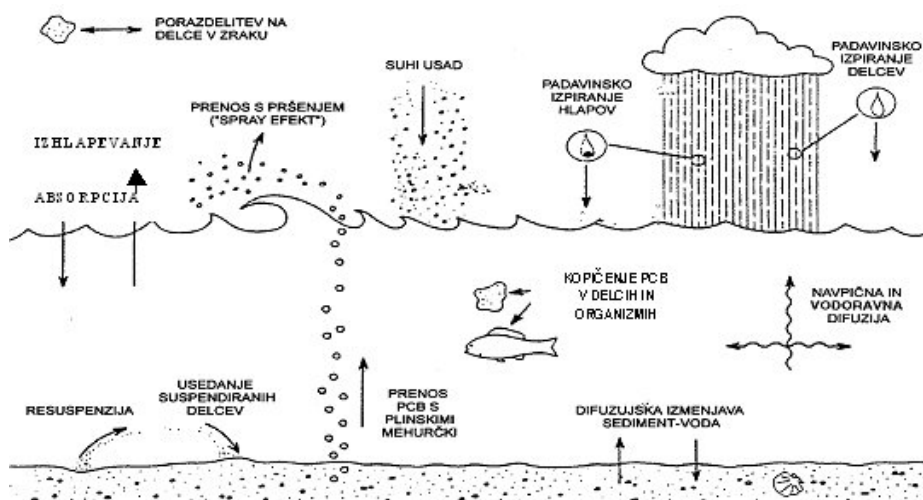
2.3 VPLIV PCB NA OKOLJE IN ORGANIZME

2.3.1 PCB v okolju

Prenos in kroženje PCB v okolju sta odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih značilnosti, predvsem pa od koncentracijskih gradientov PCB in velikosti tokov med mediji - fazami okolja:

zrak - voda - zemlja - sediment - biota, pa tudi od procesov razgradnje PCB in drugih kemijskih reakcij (Polič, 2005a). Slika 5 prikazuje prenos in tokove PCB v okolju.

PCB se najlažje in najhitreje prenašajo z gibanjem zračnih mas (Lee in Jones, 1999). V atmosferi se širijo bodisi v obliki hlapov bodisi vezani na zračne delce - aerosole (Pozo, 2007, cit. po Pankow, 1994). Na ta način so se PCB razširili po vsem svetu, tudi v predele, kjer jih niso nikoli uporabljali. Tako jih najdemo vse od polarnih območij do dna oceanov (Baird, 2003). Koncentracije PCB v zraku so odvisne od bližine vira onesnaženja, velikosti emisij in meteoroloških razmer (Atlas in sod., 1986). Pomembna je tudi reverzibilna izmenjava PCB med onesnaženo vodo in zrakom (Bamford in sod., 2002) ter zemljo/sedimenti in zrakom (Cousins in Jones, 1998). Haugen in sod. (1999) izpostavljajo temperaturo kot najpomembnejši meteorološki dejavnik, ki povzroča sezonska koncentracijska nihanja. Povprečni zadrževalni časi PCB v atmosferi so od 2 do 80 dni (Polič, 2005a).



Slika 5: Prenosi in tokovi PCB v okolju (sediment, delci - voda - zrak - organizmi)
 (prirejeno po Mackay, 1985: str. 93)

V zemljo in vodo pridejo PCB z mokrim in suhim usedanjem iz zraka (Lee in Jones, 1999). Površinske in podzemne vode se onesnažijo tudi z industrijskimi in komunalnimi odplakami ter s spiranjem, izcejanjem PCB iz onesnaženega površja. V vodi so PCB bodisi raztopljeni ali pa so vezani na sedimente oz. suspendirane delce (Polič, 2005a). Različni avtorji (Chuiko in sod., 2007; Cousins in Jones, 1998; Magnusson in sod., 2006) trdijo, da

so onesnaženi sedimenti oz. zemlja lahko vir nadaljnjega onesnaževanja vod, zraka in organizmov.

Biodegradacija PCB poteka v glavnem s pomočjo bakterij in gliv. Na splošno se s stopnjo kloriranja razgradnja v okolju zmanjšuje (Furukawa, 1986). V anaerobnih sedimentih je favorizirana razgradnja višje kloriranih PCB. Končni produkt anaerobne mikrobne razgradnje so *orto* substituirani PCB, ki so odporni na nadaljne mikrobne spremembe (Chiarenzelli in sod., 1997). Aerobni organizmi lažje razgrajuje nižje klorirane PCB. Najpogostejši način je s hidroksilacijo (Walker, 2001).

2.3.2 Vnos PCB v organizme

Organizmi akumulirajo PCB iz atmosfere, vode in hrane. Glavna pot vnosa za kopenske organizme je hrana, za vodne organizme pa poleg kontaminirane hrane še dihala (škrge) in koža (Shaw in Connel, 1986). Eisler (1986, cit. po Fox in sod. 1983) ter Magnusson in sod. (2006) so odkrili, da je koncentracija PCB v jezerskih oz. morskih sedimentih linearno povezana z vsebnostjo PCB v nevretenčarjih, ki živijo na dnu.

Na splošno je kopičenje PCB v organizmih odvisno od časa izpostavljenosti in koncentracij PCB v njihovem življenjskem okolju (Polič, 2005a).

Najpomembnejši parameter za določitev ogroženosti organizmov v okolju, onesnaženem s PCB, je biokoncentracijski faktor BCF, ki je podan z razmerjem ravnotežnih koncentracij PCB v organizmu (c_b) in koncentracij PCB v okolju - zrak (c_z), voda (c_v), zemlja (c_{ze}) ali sediment (c_s) (Polič, 2005a). Za vodne organizme je biokoncentracijski faktor v vodi podan z naslednjo enačbo (Gobas in Morrison, 2000):

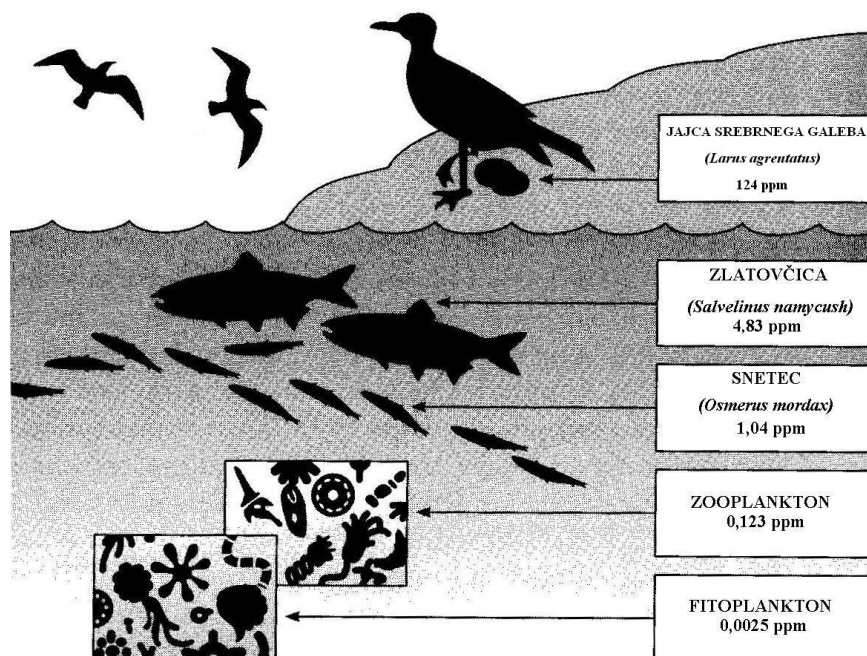
$$BCF = \frac{c_b}{c_v} \quad \dots (2)$$

c_b ... koncentracija PCB v organizmu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

c_v ... koncentracija v vodi ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Biokoncentracijski faktor lahko doseže pri nekaterih organizmih na vrhu prehranjevalne verige vrednosti milijon (10^6) (Polič, 2005a).

Za PCB je značilna tudi biomagnifikacija. Gre za večanje koncentracije PCB po prehranjevalni verigi (Walker, 2001). Na Sliki 6 je primer bioakumulacije in biomagnifikacije v prehranjevalni verigi severnoameriških Velikih Jezer. Višje kot je organizem v prehranjevalni verigi, višja je načeloma vsebnost PCB v njem. V jajcih galebov, ki živijo ob Velikih Jezerih, je tako vsebnost PCB skoraj za 50 000-krat večja, kot v fitoplanktonu (Baird, 2003).



Slika 6: Bioakumulacija in biomagnifikacija iz severnoameriških Velikih Jezer
(prirejeno po Baird 2003: 342)

2.3.3 Metabolizem PCB

V splošnem se PCB slabo presnavljajo in se zato zelo počasi izločajo iz telesa. Posledica počasnega izločanja je že omenjena bioakumulacija ter posledično biomagnifikacija. Zaužiti PCB iz prebavnega trakta preidejo v kri, nato v jetra in mišično tkivo, šele potem v kožo in maščobno tkivo. Nekateri se akumulirajo v telesu več let, spet drugi se izločijo v

nekaj dneh (Cencič-Kodba, 1998). Delež izločenih PCB je odvisen od števila in razporeditve klorovih atomov v molekuli. Množina nespremenjenih PCB kongenersov, ki se izločijo iz organizma, je majhna. Nekateri nespremenjeni PCB pri sesalcih preidejo preko placente v razvijajoči se plod. Transportirajo se tudi v materino mleko. Pri ptičih, dvoživkah, plazilcih in žuželkah pa prehajajo v jajca. Transport naj bi potekal s pomočjo lipoproteinov.

Metabolizem PCB primarno poteka s hidroksilacijo obročev, pri kateri posredujejo različne oblike encima citokrom P450. Nastajajo fenolni metaboliti. Nižje klorirani kongenseri se metabolizirajo hitreje, saj imajo v molekuli več prostih mest, kjer lahko pride do hidroksilacije. Mesto vezave encima namreč najlažje poteka na obročih, kjer sta sosednji mesti *orto* in *meta* ali pa *meta* in *para* nesubstituirani, saj encim redko oksidira mesta na katera je vezan klor (Walker, 2001).

2.3.4 Toksičnost PCB

Akutna toksičnost mešanic PCB pri vretenčarjih ni velika, npr. 1 - 10 g kg⁻¹ pri podganah. Zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti predstavljajo večji problem pri subletalnih dozah oz. pri kronični izpostavljenosti (Walker, 2001: 131). Toksičnost PCB ovrednotimo s toksičnimi ekvivalentnimi faktorji (TEF - toxic equivalency factor). Ti za opazovane spojine povedo njihovo toksičnost relativno na 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (2,3,7,8-TCDD), ki je bila ob uvedbi TEF najbolj poznana strupena spojina. Izbrana spojina spada med poliklorirane dibenzo-p-dioksine (PCDD) in ima predpisano TEF vrednost 1 (Van den Berg in sod., 1998). V Preglednici 4 so podani TEF za nekatere PCB pri ribah, ptičih in sesalcih. PCB ne dosejajo takšne toksičnosti kot 2,3,7,8-TCDD. Tako je toksičnost PCB za ribe v povprečju 50 000-krat manjša, za sesalce 9000-krat manjša in za ptiče samo 200-krat manjša.

Preglednica 4: Toksični ekvivalenti faktorji (TEF) nekaterih PCB za ribe, ptiče in sesalce
(Van der Berg in sod. 1998)

PCB kongeners	TEF		
	ribe	ptiči	ljudje/sesalci
<i>ne-orto</i> PCB			
3,3',4,4' - tetraklobifenil (77)	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-2}$	10^{-4}
3,4,4',5 - tetraklorobifenil (81)	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-1}	10^{-4}
3,3',4,4',5 - pentaklorobifenil (126)	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-1}	10^{-1}
3,3',4,4',5,5' - heksaklorobifenil (169)	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-3}	10^{-2}
<i>mono-orto</i> PCB			
2,3,3',4,4' - pentaklorobifenil (105)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}	10^{-4}
2,3,4,4' - pentaklorobifenil (114)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$
2,3',4,4',5 - pentaklorobifenil (118)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-4}
2',3,4,4',5 - pentaklorobifenil (123)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-4}
2,3,3',4,4',5 - heksaklorobifenil (156)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$
2,3,3',4,4',5' - heksaklorobifenil (157)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$
2,3',4,4',5,5' - heksaklorobifenil (167)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-5}
2,3,3',4,4',5,5' - heptaklorobifenil (189)	$< 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-4}

Toksičnost PCB podamo kot toksični ekvivalent (TEQ - toxic equivalent), ki ga lahko uporabimo za različne okoljske oz. biološke vzorce. TEQ izračunamo kot vsoto produktov koncentracij posameznih kongenersov v vzorcu in pripadajočih toksičnih ekvivalentnih faktorjev:

$$TEQ_{PCB} = \sum (PCB_i \cdot TEF_i) \quad \dots (3)$$

PCB_i ... koncentracija posameznega PCB kongenersa

TEF_i ... toksični ekvivalentni faktor posameznega PCB kongenersa

TEQ nam pove relativno toksičnost posameznih kongenersov oz. njihove mešanice glede na 2,3,7,8-TCDD (Van den Berg in sod., 1998). V primeru ameriškega mukavca (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) znaša letalna doza (LD_{50}) 2,3,7,8-TCDD $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Rice in sod., 2003). Torej je npr. LD_{50} PCB 77 za mukavca, če uporabimo TEF za ribe, enaka 5 mg g^{-1} . Za usmrnitev mukavca z omenjenim kongenersom bi tako potrebovali 10 000-krat večji odmerek, kot če bi uporabili 2,3,7,8-TCDD.

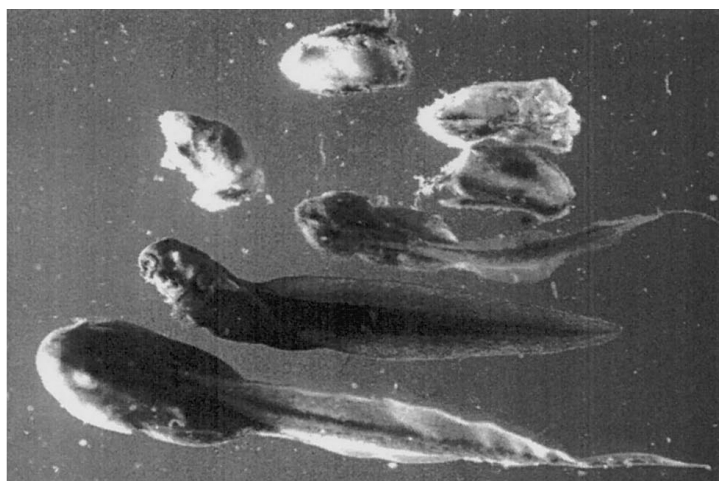
2.3.5 PCB in dvoživke

Zaradi semipermeabilne kože, razvoja jajc in ličink v vodi ter prehoda iz herbivornih paglavcev v karnivorne odrasle, so dvoživke zelo občutljive na onesnaženje svojega habitata s toksičnimi snovmi (Gutleb in sod., 1999, cit. po Freda in Dunson, 1985). Mnogi raziskovalci so določili povečane koncentracije PCB pri dvoživkah, predvsem brezrepnih (o. Anura) (Antoniadou in sod., 2007; de Solla in sod., 2002; Duda Gilliland in sod., 2001; Fontenot in sod., 2000; Ryan Loveridge in sod., 2007). V splošnem so brezrepe dvoživke manj občutljive na PCB v primerjavi z ostalimi vretenčarji, predvsem sesalci (Sparling, 2000).

V znani literaturi do sedaj ni podatkov o vsebnosti PCB v človeških ribicah, medtem ko je kopičenje težkih kovin v njihovih tkivih podrobneje dokumentirano (Bulog in sod., 2002).

Gutleb in sod. (1999) so dokazali, da PCB v okoljsko primerljivih koncentracijah vplivajo na preživetje in razvoj, tako zarodkov kot paglavcev afriške krempljičarke (*Xenopus laevis* Daudin, 1802; f. Pipidae) ter sekulje (*Rana temporaria* L., 1758; f. Ranidae). Zarodki in paglavci samic, ki so dobile naenkrat toliko tehnične mešanice Clophen A50, da je bila nato vsebnost v žabah 0,05, 5 oz. 125 $\mu\text{g g}^{-1}$ tkiva, so kazali povečano deformiranost, predvsem repa (Slika 7). Povečana je bila tudi smrtnost in zmanjšana telesna teža paglavcev ob metamorfozi. Pri ličinkah, ki so se razvijale v vodi onesnaženi s PCB, so bili najpogostejši edemi, deformiranost oči in repa, depigmentacija ter povečana smrtnost. Pojavile so se tudi motnje v gibanju. PCB naj bi vplivali na homeostazo retinoidov in hormonov ščitnice, ki naj bi bili pomembni za pravilen (embrionalni) razvoj in metamorfozo ličink dvoživk. Podobne učinke so opazili tudi pri paglavcih zgoraj navedenih vrst, ki so jih hranili s PCB kontaminirano hrano. Hrana je vsebovala 0,2 oz. 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ tehnične mešanice Clophen A50 (Gutleb in sod., 2000).

Pri afriški krempljičarki prehranjevanje s PCB kontaminirano hrano v larvalnem obdobju povzroča izgubo zaznavanja visokih frekvenc zvoka pri odraslih živali. Paglavci so uživali hrano z vsebnostjo tehnične mešanice Aroclor 1254 50 oz. 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Katbamna in sod., 2006).



Slika 7: Zarodki in paglavci s PCB ($125 \mu\text{g g}^{-1}$ tehnične mešanice Clophen A50) tretirane samice sekulje (*Rana temporaria*). Paglavec na dnu je iz kontrolne skupine samic (prirejeno po Gutleb in sod., 1999)

Jofré in Karasov (2008) sta opazila, da *orto* substituirana PCB 77 in 101 v koncentracijah 0,5 oz. $50 \mu\text{g L}^{-1}$, katerim so bili izpostavljeni mresti leopardjih žab (*Rana pipiens* Schreber, 1782; f. Ranidae), povzročata manjšanje deleža samcev v populaciji paglavcev. Nastajajo medspolniki. Gre za osebkke, katerih gonade imajo lastnosti obeh spolov. *Orto* substituirani PCB se namreč zaradi svojih strukturnih lastnosti lahko vežejo na estrogenske receptorje. PCB naj bi imeli tudi genotoksične učinke na dvoživke (Sparling, 2000, cit. po Fernandez in sod. 1989).

Gendron in sod. (1997) so odkrili vpliv PCB na sproščanje kortikosteroidnih hormonov interrenalnih teles pri pisanem nekturu (*Necturus maculosus* Rafinesque, 1818; f. Proteidae) iz onesnaženih območij (Slika 8). Nekturi so najbližji sorodniki človeške ribice (Aljančič in sod. 1993: 7). Prav tako so obligatni neoteni (Bulog, 1994). Najdemo pa jih v Severni Ameriki, kjer živijo na dnu površinskih vod (IUCN ... , 2006). Glavna hormona interrenalnih teles pri dvoživkah sta kortikosteron in aldosteron (Gendron in sod., 1997, cit. po Herman, 1992). Ob stresu kortikosteron poveča tvorbo glukoze v jetrih. Posledično se zviša koncentracija glukoze v krvi (Randall in sod., 2002). Obnavlja tudi rezerve glikogena v jetrih (Gendron in sod., 1997, cit. po Hanke in Leist, 1971). Samice nekturov, iz območij kontaminiranih s PCB (vsebnost PCB v gonadah samic so bile med 1 in $58 \mu\text{g g}^{-1}$), so imele pri nenadnem stresu (ulov in kratko pridržanje) nižjo koncentracijo kortikosterona v

krvi, kot samice iz neonesnaženih področij. Tako samci kot samice iz onesnaženih območij so imeli, v primerjavi s kontrolno skupino osebkov, manj glikogena v jetrih. Tudi po tretiranju z adenokortikotropnim hormonom (ACTH) ter ponovni izpostavitvi stresu sta imela oba spola nižjo vsebnost kortikosterona v krvi (Gendron in sod., 1997).



Slika 8: Pisani nektur (*Necturus maculosus* Rafinesque, 1818) (foto: E. R. Degginger)

Pri nekturih iz porečja reke Sv. Lovrenca v Kanadi, ki sodi med onesnažena področja s PCB, so opazili deformacije prstov - polidaktilijo pri enih oz. zraščenoost prstov pri drugih osebkih. Vsebnost PCB v osebkih je bila med 0,5 in 60 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Shirose in sod., 1996).

2.4 DRUGA OBSTOJNA ORGANSKA ONESNAŽILA

Večino organskih onesanžil sintetiziramo zaradi njihove komercialne uporabe. Dioksini (PCDDs) in furani (PCDFs) pa nastajajo kot stranski produkti pri proizvodnji kloriranih spojin ter pri sežiganju odpadkov, ki vsebujejo klorirane spojine, pri temperaturah nižjih od 1200 °C in v odsotnosti kisika (Walker, 2001). Podobno velja za policiklične aromatske ogljikovodike (PAHs) (Tamakawa in sod., 2004).

Velik okoljski problem predstavlja tudi prekomerna raba pesticidov, ki vsebujejo klorirane ogljikovodike. Prvi množično uporabljan je bil DDT (dikloro-difenil-trikloroetan). DDT je široko spektralni insekticid, ki se je v svetu največ uporabljal za zatiranje tifusa in komarjev na območjih z malarijo. V Sloveniji pa za zatiranja koloradskega hrošča

(*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824) in pršic, ki napadajo vinsko trto. Z dehidroklorinacijo DDT nastane DDE (dikloro-difenil-dikloroetilen). DDE je obstojnejši od DDT, vendar je njegova akutna toksičnost manjša. Podobno kot PCB je lipofilen, v okolju se bioakumulira in biomagnificira. Zato je v ekosistemih še vedno zelo pogost, čeprav je bila uporaba DDT prepovedana že v sedemdesetih letih (Walker, 2001).

2.5 OBMOČJE REKE KRUPE

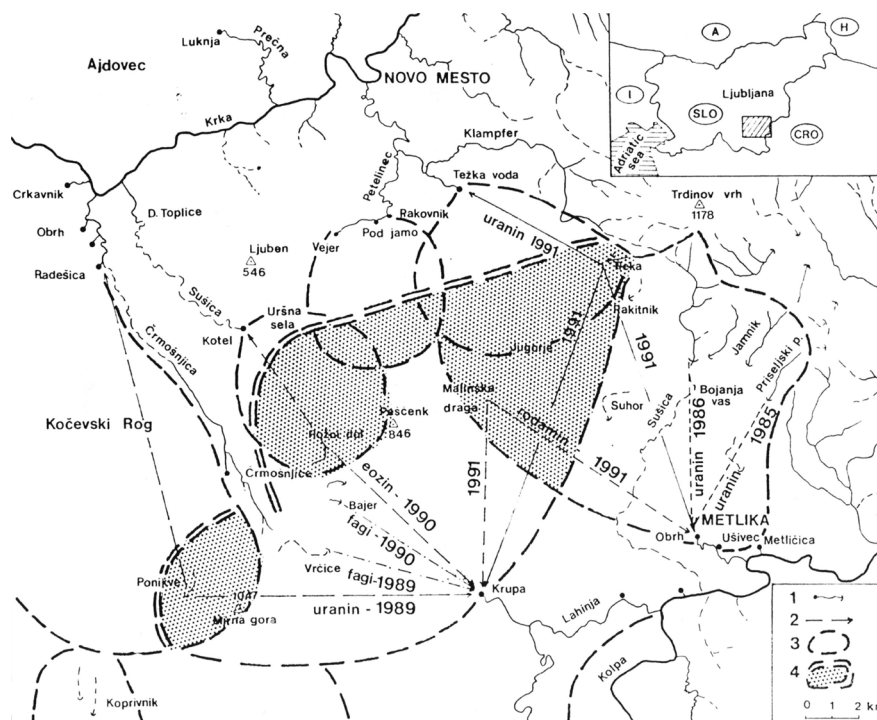
2.5.1 Značilnosti

Krupa izvira sredi severnega dela nizkega belokranjskega kraškega ravnika, okoli 3 km južno od Semiča, pod vasjo Krupa (Plut, 1988). Izvir Krupe leži na okoli 135 m nadmorske višine (Slika 9). Struga je vzdolž toka vrezana v skoraj 30 m globoko skalnato sotesko. Vzdolž toka je tudi več izvirov. Izliva se kot levi pritok reke Lahinje, 2,6 km nižje pri vasi Klošter (Ivanovič in sod., 1997). S povprečnim letnim minimalnim pretokom okoli $1 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ je Krupa najbolj vodnat belokranjski izvir. Srednja letna temperatura vode niha med 10 in 12 °C (Plut, 1988).



Slika 9: Izvir reke Krupe (foto: L. Pezdirc, 2008)

Zaledje reke je kraško, pretrto s številnimi prelomi različnih smeri. Odložene so debele skladovnice pretežno karbonatnih kamnin, apnencev in dolomitov. Sega do obronkov Kočevskega Roga in Gorjancev. V zaledju je več kraških ponikalnic, ki imajo podzemeljske povezave s Krupo (Slika 10).



Slika 10: Hidrografska skica ozemlja med Krko in Krupo (prirejeno po Habič in Kogovšek, 1992)

- 1) ponikalnica z izviro in ponorom, 2) dokazana vodna povezava, 3) zaledje kraškega izvira, 4) bifurkacijsko zaledje Krupe

Za Krupo so značilne kraške hidrološke zakonitosti z zakasnitvijo odtokov, zadrževanjem vode v podzemlju in pretakanjem vode pod površjem (Habič in Kogovšek, 1992).

Območje reke je vrstno pestro. Izvirno jezero je edino slovensko nahajališče jamske školjke (*Congeria kusceri*) in nekaterih endemnih vrst jamskih polžev (*Sadleriana scmidtii*, *Hauffenia media*, *Iglica gracilis* in *Hadziella krkae*). Tu se nahaja populacija človeške ribice. Vse to Krupo od leta 1997 uvršča med naravne spomenike Slovenije (Ivanovič in sod. 1997). Po saprobnem indeksu spada izvir Krupe v drugi kakovostni razred ali zmerno obremenjen vodotok (Povše, 2005: 5).

2.5.2 Onesnaženje

Leta 1962 so v tovarni ISKRA Kondenzatorji v Semiču pričeli s proizvodnjo kondenzatorjev z uporabo impregnanta PCB kot dielektrika. Do leta 1970 so v tovarni uporabljali komercialni tehnični mešanici PCB Clophen A-30 in A-50 s 30 % oz. 50 % vsebnostjo klora. Po tem letu, pa do 1985, so uporabljali PCB s komercialnim imenom Pyralene 1500 s podobno vsebnostjo klora kot Aroclor 1242 (42 %). Celokupna poraba PCB je v obdobju od leta 1962 pa do februarja 1985, ko je bila proizvodnja s PCB v Sloveniji prepovedana, znašala okrog 3700 t. Od tega je bilo emisij in odloženih odpadkov PCB v okolje 70 t (Preglednica 5). Odpadki so bili odloženi na večih lokacijah (Slika 11). Največji del (43 t) na tovarniško odlagališče in vrtače ob sami tovarni (Polič, 2005a).

Preglednica 5: Pregled vseh količin emisij odpadnega PCB (70 t) v širšem okolju tovarne kondenzatorjev Iskra v Semiču 1962 - 1985 (Polič, 2005a: 33)

Odpadni PCB	PCB (t)
Emisije v zrak iz tehnološkega procesa	5
Tehnološke odplake, razlitja, izgube pri manipulaciji in podobno	5
Odloženi odpadki:	
• tovarniško odlagališče	43
• vrtače v bližini proizvodne hale, divja odlagališča ob cesti Semič-Štrekljevec, neznani odvozi	2
• ostala odlagališča: Lokve pri Črnomlju, Mladica, Vranoviči, naselja in odlagališča Romov	15
SKUPAJ	70

Šele leta 1983 so prvič ugotovili visoke koncentracije PCB v vodi reke Krupe, kasneje (1984) pa tudi v zraku, sedimentu, zemlji, bioti in v prehrani ljudi ter drugih bioloških materialih. Dolgoletni viri onesnaženja kraškega območja reke Krupe so bile oz. so še vedno (Polič, 2005a):

- proizvodnja oz. tehnološki proces v tovarni kondenzatorjev v Semiču (emisije, odplake, razlitja in izgube pri manipulaciji)
- odlagališča odpadkov
- onesnaženi vodni zbiralnik v kraškem vodnem zaledju reke Krupe
- fizikalni, kemični in biološki procesi ter tokovi PCB v onesnaženem okolju

Po sanaciji območja v letu 1985, ko so odstranili s PCB onesnaženo zemljo iz vseh evidentiranih odlagališč, je Polič (2005a) ocenil, da se je samo iz tovarniškega odlagališča v kraško podzemlje izcedilo 13 t odpadnega PCB.

2.5.2.1 Voda

Podzemne in površinske vode povodja reke Krupe so onesnažile tehnološke odplake, predvsem pa izcejanje in izpiranje PCB iz odlagališč odpadkov ter iz onesnažene zemlje v ožjem območju tovarne (Polič, 2005a). V letih 1983 do 1992 so bile koncentracije PCB v vodi od 0,1 do 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Polič in sod., 2000). Meritve onesnaženosti vode, ki so bile izvedene v obdobju 1995 - 2000 kažejo, da se prenos PCB iz podzemlja iz leta v leto zmanjšuje in je občasno povečan samo po močnejših padavinah v zaledju oz. ob povečanju pretokov reke. Koncentracije PCB v vodi narastejo do 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, vendar tudi hitro upadejo z upadanjem pretoka (pod 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$). To kaže, da se PCB iz podzemlja izpirajo iz neznane onesnažene cone (vodnega zbiralnika) in s prenosom onesnaženega sedimenta (suspendiranih delcev) pri povečanih pretokih. Onesnažen sediment se po toku reke premešča, obenem je relativno hitra desorpcija in resuspenzija PCB iz onesnaženega sedimenta oz. prenos predvsem bolj topnih in lahko hlapnih PCB v vodno fazo in zrak soteske reke Krupe. Vzorci odvzeti v mirujočem delu vodnega toka, v plitvini močno zamuljenega brega, kažejo praviloma vedno relativno višje koncentracije PCB (Polič, 2005a). V izviru Krupe so bile v maju in juniju 2005 določene nizke vsebnosti osmih kongenersov (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 194, 180) izražene kot vsota, ki je znašala 0,004 - 0,014 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Polič, 2005b). Maksimalna dovoljena koncentracija PCB v pitni vodi, ki jo dovoljuje ameriška vladna agencija za varstvo okolja (EPA), znaša 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Drinking ... , 2008)

2.5.2.2 Sediment

Najvišje vsebnosti PCB v sedimentu so praviloma izmerjene vedno na izviru Krupe. V letih 1983 do 1992 so bile koncentracije PCB v sedimentu med 10 in 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Polič in sod., 2000). Od leta 1995 do 2000 se je vsebnost PCB v sedimentih gibala med 0,084 in 7,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Polič, 2005b).

Polič (2005a) ugotavlja, da je močno onesnažen površinski sloj sedimenta na dnu izvira (Preglednica 6). Dne 29. 6. 1995 je znašala koncentracija PCB v površinskem sloju $185 \mu\text{g g}^{-1}$, v globini 7 do 8 cm je padla na $23 - 27 \mu\text{g g}^{-1}$. Koncentracija z globino 14 - 16 cm še pada in znaša $0,8 - 1,2 \mu\text{g g}^{-1}$. Pri vzorcih sedimenta iz globine 30 - 34 cm so bile koncentracije PCB pod $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$. Rezultati meritev vsebnosti PCB po globinskih profilih sedimenta kažejo na povečano onesnaževanje izvira reke Krupe s prenosom močno onesnaženega sedimenta (suspendiranih delcev) iz podzemlja po intenzivnejšem oz. daljšem padavinskem obdobju. Zadnje meritve PCB v sedimentu na izviro leta 2005 so pokazale vsebnost PCB $0,381 \mu\text{g g}^{-1}$ suhega sedimenta (vsota osmih kongenersov: PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 194, 180) (Polič, 2005b). Močno onesnažen sediment, ki se spira iz podzemlja, je dolgoletni vir nadaljnjega onesnaževanja vode reke Krupe ter posledično Lahinje, Kolpe in širšega območja (Polič, 2005a).

Preglednica 6: Vsebnost PCB v sedimentu izvira Krupe 1988 - 2000 (Polič, 2005a: 46)

Datum odvzema vzorca	Globina odvzema (cm)	Koncentracija PCB ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe snovi)
julij 88	0 - 7	40
september 91	neposredni zajem	25
april 93	neposredni zajem	0,4
julij 95	neposredni zajem	1,1
oktober 95	neposredni zajem	7,2
maj 2000	neposredni zajem	1,3

2.5.2.3 Vodni organizmi

Zoobentos predstavlja (skupaj z fitobentosom) začetek prehranjevalne verige za višje razvite živali, ki živijo v in tudi ob vodi. Visoke koncentracije PCB v bentosu na izviro Krupe v letu 2005 ($7,1 \mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže vodnih živalic - vsota sedmih kongenersov: PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) nakazujejo, da bodo zaradi biomagnifikacije PCB prizadete tudi višje razvite živali. Koncentracije PCB kažejo odvisnost med bližino izvira in vsebnostjo PCB ter upadejo z oddaljenostjo od izvira Krupe. Prav tako se vsebnost PCB v makrozoobentosu v reki Lahinji, po izlivu reke Krupe, močno dvigne, in sicer od $0,255 \mu\text{g g}^{-1}$ pred izlivom na $4,5 \mu\text{g g}^{-1}$ po izlivu (Posledice ... , 2005).

V Preglednici 7 je prikazana vsebnost vsote sedmih PCB kongenersov v skeletnih mišicah rib iz reke Krupe, ki so jih izmerili v letu 2005. Ribe so bile ulovljene v bližini izvira, v srednjem toku in izlivu reke. Zgornja meja dovoljenih vsebnosti PCB v ribah, ki jo je določil vladni urad ZDA za prehrano in zdravila (FDA - Food and Drug Administration USA) znaša $2 \mu\text{g g}^{-1}$ jedilnih delov ribe (FDA ... , 1977). Vsebnost PCB v vseh ribah, ki so jih analizirali, je še vedno velika in močno presega omenjeno dovoljeno mejo. Na osnovi teh podatkov sklepamo, da ribe iz reke Krupe še vedno niso primerne za prehrano ljudi (Posledice ... , 2005).

Preglednica 7: Vsebnost sedmih PCB kongenersov (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) in njihova vsota v ribah ($\mu\text{g g}^{-1}$ jedilnega dela) iz reke Krupe v letu 2005
(prirejeno po: Posledice ... , 2005: 20)

Riba (starost)	28	52	101	118	138	153	180	vsota
<i>Izlov na izviru</i>								
<i>Postrv I (3 leta)</i>	1,39	1,68	7,14	1,42	1,87	2,04	7,19	8,32
<i>Postrv II (3 leta)</i>	8,07	1,49	2,25	4,18	2,15	23,5	3,58	30,9
<i>Postrv III (4 leta)</i>	8,54	1,37	1,84	3,26	1,75	1,89	2,29	11,2
<i>Platnica I (3 leta)</i>	0,87	0,31	0,60	0,98	0,80	0,72	0,16	3,67
<i>Platnica II (4 leta)</i>	0,31	0,62	0,49	0,64	0,34	0,37	0,06	2,82
<i>Izlov v srednjem toku reke</i>								
<i>Postrv IV (3 leta)</i>	0,97	1,34	1,93	0,33	1,61	1,81	0,25	8,25
<i>Postrv V (4 leta)</i>	5,68	4,68	1,73	3,44	7,26	6,30	5,29	30,16
<i>Platnica III (3 leta)</i>	0,19	0,65	1,14	2,05	1,46	1,50	0,28	7,27
<i>Platnica IV (3 leta)</i>	0,14	0,37	0,48	0,68	0,38	0,38	0,59	2,49
<i>Podust I (4 leta)</i>	0,51	0,81	0,49	1,20	0,37	0,74	0,53	3,91
<i>Izlov na izlivu</i>								
<i>Platnica V (3 leta)</i>	0,17	0,53	0,79	1,19	0,70	0,71	0,11	4,20
<i>Podust II (4 leta)</i>	0,33	0,36	0,16	0,54	0,54	0,48	0,32	2,10
<i>Podust III (4 leta)</i>	0,25	0,71	0,83	1,34	0,93	0,91	0,15	4,98
<i>Mrena I (4 leta)</i>	0,15	0,57	1,18	2,56	1,93	1,86	0,43	8,68

2.5.2.4 Dinamika onesnaženja v prihodnosti

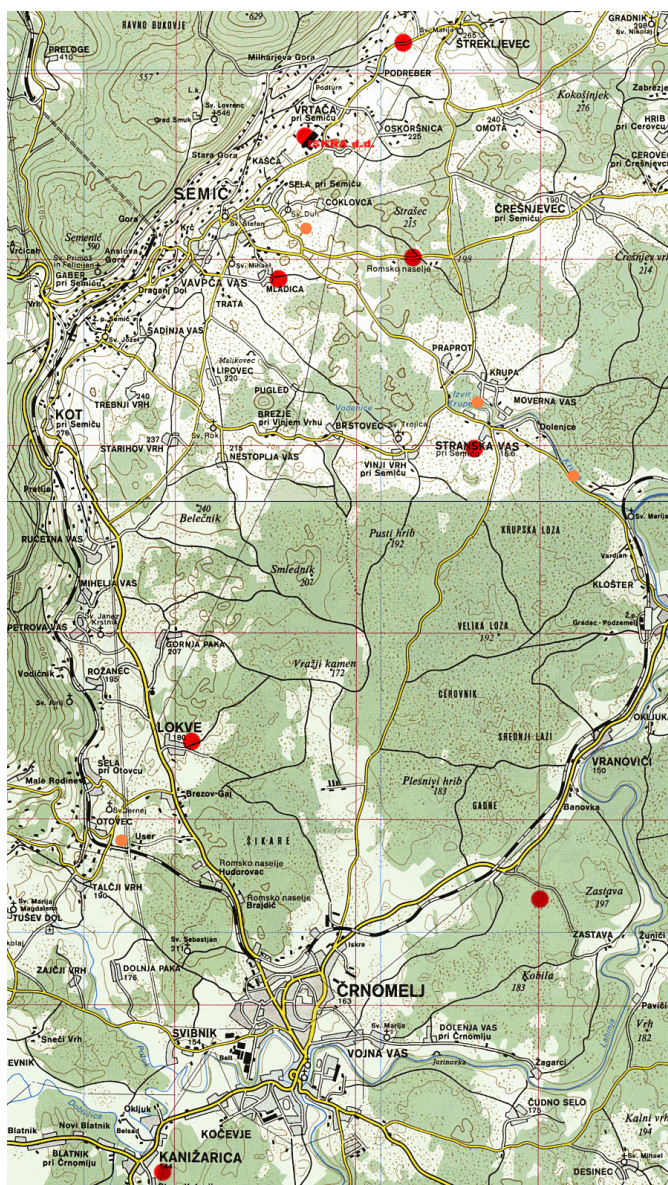
V letih 2010 - 2015 se bo po modelni oceni, ki jo je izdelal Polič (2005a), izpralo oz. preneslo iz podzemlja le še okoli 50 kg PCB. Povprečne letne koncentracije PCB v vodi

reke Krupe bodo padle pod $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, v zraku na rečnih bregovih tudi pod $10 \mu\text{g m}^{-3}$ in v postrvih pod $10 \mu\text{g g}^{-1}$. Modelna ocena predvideva, da naj bi bilo po letu 2015 dokončno sanirano stanje prizadetega območja oz. očiščeno kraško podzemlje in vodni zbiralnik ter izvir reke Krupe, saj se pričakuje več kot dvajsetkrat nižje koncentracije od dovoljenih v pitni vodi, ki veljajo v Evropski Uniji, tj. $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Direktiva ... , 1998).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORČEVALNA MESTA

Človeške ribice so bile ujete v izviru reke Krupe, v izviru Otovski breg pod vasjo Otovec pri Črnomlju in v Planinski jami. Sedimente smo vzorčevali, poleg zgoraj omenjenih lokacij, še v jami Lebici pri Semiču in v potoku okoli 1,7 km dolvodno od izvira reke Krupe. Vzorčevalna mesta v okolici Krupe so prikazana na Sliki 11.



Slika 11: Znana odlagališča (rdeče) in vzorčevalna mesta (oranžno) v okolici reke Krupe (prirejeno po: Atlas ... , 1992; Polič, 2005a; Plut, 1987)

3.2 ČLOVEŠKE RIBICE (*Proteus anguinus anguinus*)

Živali iz izvira Krupe so bile ujete med nočnim potopom v času polne lune z ročno mrežo, ena od njih se je ujela v vršo (P190). V Otovskem bregu so živali ujeli z vršami, v Planinski jami pa z ročno mrežo. Človeške ribice so bile pripeljane v hladilnih torbah v speleobiološki laboratorij Oddelka za biologijo v akvarije s temperaturo vode okoli 11 °C. Živali smo narkotizirali v 0,3 % MS 222 (m-aminobenzoat metasulfonske kisline) in humano usmrtili z dekapitacijo. Po končani sekciji smo posamezna tkiva zamrznili pri -20 °C.

Analizirali smo tkiva petih človeških ribic iz izvira reke Krupe, treh iz Otovskega brega in treh iz Planinske jame. Vsak osebek ima svojo oznako. V Preglednici 8 so podane značilnosti ujetih človeških ribic v izviru Krupe, v Preglednici 9 pa iz ostalih nahajališč.

Preglednica 8: Datum ulova in lastnosti ujetih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz izvira Krupe (/ ... ni bilo mogoče določiti)

	P186	P188	P187	P189	P190
Datum ulova	6. 10. 2006	30. 6. 2007	6. 10. 2006	3. 7. 2008	30. 9. 2006
Dolžina osebk (cm)	24,1	26	18,05	22,6	24,7
Teža (g)	25,85	32,65	9,05	16,5	20,43
Spol	♂	♂	♀	♀	♀
Spolna zrelost	da	da	ne	ne	/
Ocenjena starost (leta)	≥ 14	≥ 14	< 14	< 14	/

Preglednica 9: Datum ulova in lastnosti ujetih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz Otovskega brega in Planinske jame (/ ... ni bilo mogoče določiti)

	P144	P145	P164	P159	P160	P161
Datum ulova	14. 10. 1999	14. 10. 1999	17. 7. 2003	28. 1. 2003	28. 1. 2003	28. 1. 2003
Nahajališče	Planinska jama	Planinska jama	Planinska jama	Otovski breg	Otovski breg	Otovski breg
Dolžina osebka (cm)	21,9	26,2	24	28	27	26,5
Teža (g)	16,13	22	10,62	29,8	36,9	27,3
Spol	♂	♀	/	♂	♂	♂

3.3 SEDIMENTI

Sedimente smo vzorčevali po daljšem obdobju lepega vremena, ko se pretok vode zmanjša. Na vseh vzorčevalnih mestih smo najprej odstranili vrhno plast petih centimetrov, nato smo odvzeli sedimente ter jih shranili v steklene posode. Do nadaljne obdelave so bili vzorci shranjeni v hladilniku (~ 5 °C).

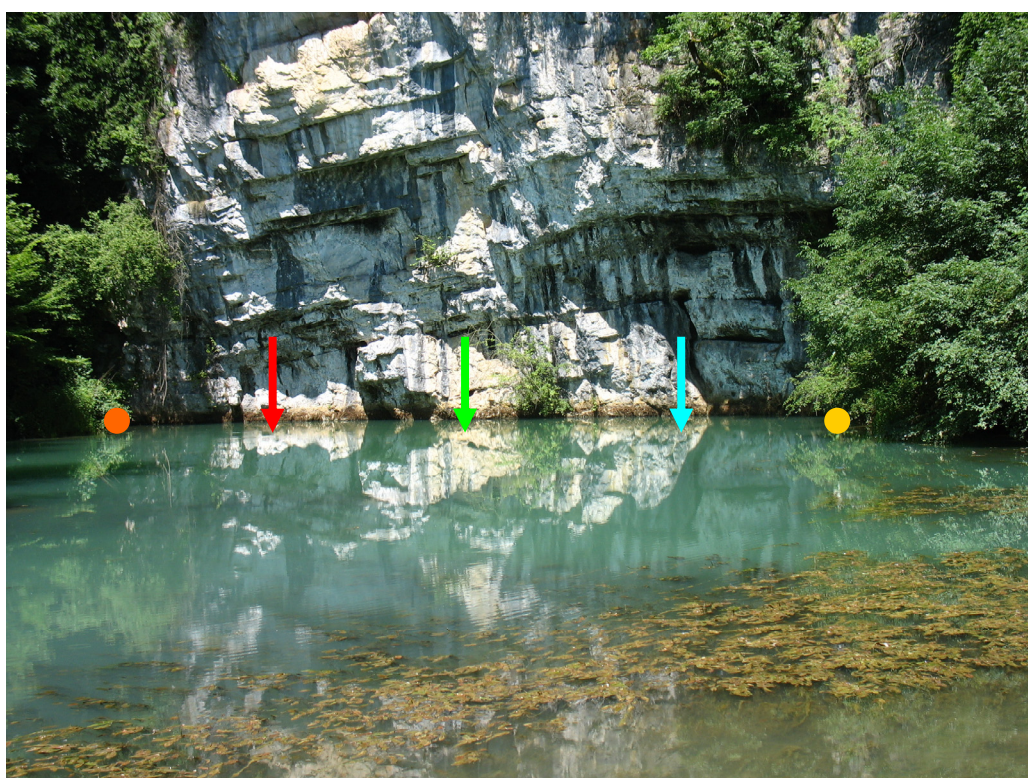
3.3.1 Območje reke Krupe

3.3.1.1 Krupa

Vzorčevalno mesto '*plitvina II*' je zamuljen položen del levega brega reke nad drugim jezom, okoli 300 m dolvodno od izvira (Slika 12). Vzorčevalno mesto '*plitvina I*' je podobno. Nahaja se tik za izvirom ter je zaraščeno z makrofiti (Slika 12). Na obeh vzorčevalnih mestih je rečni tok relativno umirjen. Sedimenti so bili odvzeti 24. februarja 2008 na globini vode okoli 30 cm. Temperatura vode je bila na obeh vzorčevalnih mestih 11,0 °C, zraka pa 18,0 °C (ob deseti uri dopoldne).



Slika 12: Vzorčevalni mesti 'plitvina I' in 'plitvina II' na oz. ob reki Krupi (prirejeno po Geopedia ... 2008)



Legenda: desni breg ● ; dno_D ↓ ; dno_S ↓ ; dno_L ↓ ; levi breg ●

Slika 13: Vzorčevalna mesta sedimentov na izviri reke Krupe (foto: M. Pezdirc, 2008)

Vzorčevalno mesto '*desni breg*' je nekaj metrov oddaljeno od skalne stene. Gre za strm ilovnati desni breg na samem izviru. Vzorčevalno mesto '*levi breg*' je podobno, le da je na levem bregu samega izvira (Slika 13). Sedimenti so bili odvzeti 24. februarja 2008 na globini vode okoli 30 cm. Temperatura vode na izviru je bila 11,0 °C, zraka pa 18,0 °C (ob deseti uri dopoldne).

Sedimente z dna izvira so potapljači odvzeli na treh mestih, nekaj metrov od previsne stene 22. aprila 2008. Vzorce smo poimenovali '*dno_D*', '*dno_S*' in '*dno_L*' (Slika 13). Globina izvira je okoli 5 m.

3.3.1.2 Izvir ob reki Krupi

Vzorčevalno mesto, ki smo ga poimenovali '*potok*', se nahaja ob desnem bregu Krupe, okoli 1,7 km dolvodno od izvira. Voda prihaja na dan iz ozke jame pod skalo. Po dveh do treh metrih toka se izliva v Krupo (Slika 14). Pretok vode je majhen.



Slika 14: Izvir ob reki Krupi oz. vzorčevalno mesto '*potok*' (foto: M. Pezdirc, 2008)

Sedimenti so bili odvzeti 7. aprila 2008 pod skalo na globini okoli 30 cm. Temperatura vode je bila 11,0 °C, zraka pa 15,0 °C (ob enajsti uri dopoldne).

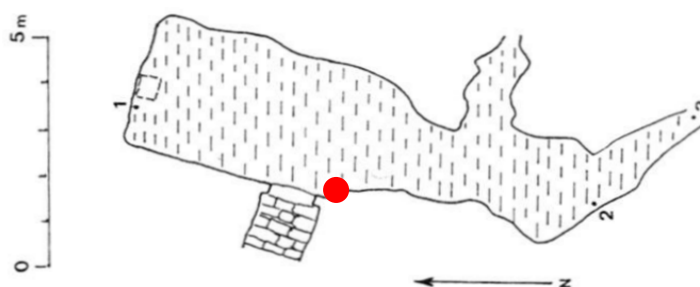
3.3.1.3 Lebica

Lebica je manjša vodna jama pri Semiču. Odpira se v plitvi vrtači (Slika 15). Prvotno je imela jama obliko vodne kotanje, ki se je nadaljevala v krajši potopljeni rov. Nato pa so vhod obzidali. Vodna dvorana je dolga 10 m in široka 3 m. Na koncu sta dva krajša potopljena rova (Slika 17) (Ladišič, 2002). Podzemeljske povezave s Krupo še niso dokazali (Habič in Kogovšek, 1992).



Slika 15: Vhod v Lebico (foto: L. Pezdirc, 2008)

Sedimenti so bili odvzeti 16. maja 2008 na skalni polici v jami (Slika 16). Temperature vode je bila 10,5 °C, zraka v jami pa 11,0 °C.



Slika 16: Načrt jame Lebice z vzorčevalnim mestom (prirejeno po Ladišič, 2002)

3.3.2 Otovski breg

Otovski breg je manjši izvir pod vasjo Otovec pri Črnomlju. V globeli izvira voda, ki po nekaj metrih spet ponikne (Slika 17). Gre za znano lokaliteto človeške ribice.



Slika 17: Otovski breg z vzorčevalnim mestom (foto: M. Pezdirc, 2008)

Sedimenti so bili odvzeti 23. marca 2008 na globini vode okoli 10 cm (Slika 18). Temperatura vode je bila 10,7 °C, zraka pa 16,0 °C (ob tretji uri popoldne).

3.3.3 Planinska jama

Vhod v Planinsko jamo se odpira v južnem delu Planinskega polja. Iz nje priteka Unica, ki nastane z združitvijo rek Pivke in Raka v jami. V jami se zbirajo vode iz Javornikov, Rakovega Škocjana, Cerkniskega, Loškega in Babnega polja, Bloške planote ter Postojnske kotline. Skupna dolžina rovov v Planinski jami znaša čez 6,6 km. Za vhomom se glavni rov razdeli v dva rokava, Pivški in Rakov rokav. Planinska jama skupaj s Postojnsko jamo predstavlja največji jamski sistem v Sloveniji. Obe sta znani lokaliteti človeške ribice (Gams, 2003).

Sedimente smo vzorčevali 18. maja 2008 v Pivškem rokavu ('Pivški rokav') v jezeru pred Golgoti, na globini okoli 20 cm. Temperatura vode je bila 10,0 °C. Na vhodu jame ('vhod

Pl. jame') smo sedimente vzorčevali na globini vode okoli 30 cm (Slika 18). Temperatura vode je bila 12,0 °C.



Slika 18: Vhod v Planinsko jamo z označenim vzorčevalnim mestom 'vhod *Pl. jame'*
(prirejeno po: foto M. Rok)

3.4 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO

Ker smo pri analiziranju nekaterih tkiv človeških ribic nepričakovano določili povišano vsebnost 4,4'-DDE (glej Poglavje 4), navajamo material in metode za določevanje obeh vrst spojin, PCB in 4,4'-DDE, v vzorcih.

V postopku priprave in analize vzorcev smo uporabili reagente in materiale:

- 95 % n-heksan ("Baker Ultra Resi-Analyzed", Mallinckrodt Baker, Deventer, Nizozemska)
- diklorometan ("Baker Ultra Resi-Analyzed", Mallinckrodt Baker, Deventer, Nizozemska)
- aceton ("Baker Ultra Resi-Analyzed", Mallinckrodt Baker, Deventer, Nizozemska)
- 96 % H₂SO₄ p.a. (ISO-for analysis, Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Italija)
- 37 % HCl (ISO-for analysis, Carlo Erba Reagenti SpA, Rodano, Italija)
- Na₂SO₄ brezvodni (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

- florisil (»Florisil[®] PR 60/100 mesh«, Supelco, Bellefonte, ZDA)
- ekstrakcijski celulozni tulci MN 645 30x100 mm (Machery-Nagel & Co. KG, Düren, Nemčija)
- steklena volna ("untreated", Supelco, Bellefonte, ZDA)
- voda za kromatografijo (Water for Chromatography, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- čiščen in reduciran baker v prahu (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- standardna raztopina 2,4,6-triklorobifenil (PCB 30, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Nemčija)
- standardna raztopina 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-dekaklorobifenil (PCB 209, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Nemčija)
- standardna raztopina izbranih PCB kongenersov (28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180 - MIX21, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Nemčija)
- standardna raztopina za 4,4'-DDE (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Nemčija)

Uporabili smo tudi naslednje aparature in orodja:

- liofilizator Christ[®] Alpha 2-7 (Christ, Osterode, Nemčija)
- 62 µm sito (Retsch, Haan, Nemčija)
- Soxhlet aparat model Wheaton-33 (Wheaton Science Products, Millville, ZDA) z grelci Multi-unit extraction heater 5000 (Lab-Line[®], Melrose Park, ZDA)
- centrifuga (LC-320, Tehnica, Železniki, Slovenija)
- ultrazvočna kopel (model 550D, VWRTM)
- plinski kromatograf sklopljen z detektorjem na zajetje elektronov (HP 6890 Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija)
- plinski kromatograf z masno selektivnim detektorjem (HP 6890 Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija)

3.4.1 Tkiva človeških ribic

Tkivo osebka, katerega sveža masa je znašala manj kot 1 g, smo združili z enakim tkivom enega ali več osebkov iz iste lokalitete (Preglednica 10).

3.4.1.1 Liofilizacija in homogenizacija

Vzorci tkiv človeških ribic smo liofilizirali štiri dni v liofilizatorju pri temperaturi $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in tlaku 30 kPa. Potem smo jih homogenizirali. Tako pripravljena tkiva smo do ekstrakcije shranili v zamrzovalniku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Preglednica 10: Sveža masa (g) tkiv človeških ribic (*Proteus anguinus*)

Osebek	skeletne mišice	adipozno tkivo	jetra z žolčnikom	prebavna cev s pankreasom	ledvica	visceralno maščevje
IZVIR KRUPE						
P186	4,80	3,94	1,19	0,76	0,17	0,05
P187	1,96	0,88	0,59	0,42	0,15	0,06
P188	9,43	5,82	1,41	1,55	0,29	0,13
P189	3,46	1,62	0,74	0,74	0,15	0,10
P190	3,60	1,75	0,65	0,86	0,14	0,19
OTOVSKI BREG						
P159	1,92	/	0,66	/	/	/
P160	3,89	0,25	1,27	/	/	/
P161	2,69	0,56	0,52	/	/	/
PLANINSKA JAMA						
P144	/	/	0,08	/	/	/
P145	/	/	/	/	/	/
P164	2,67	/	/	/	/	/

3.4.1.2 Ekstrakcija

Liofilizirane vzorce tkiv (približno 0,5 g) smo zatehtali v predhodno očiščene ekstrakcijske celulozne tulce. Vzorce smo v tulcih zmešali z brezvodnim natrijevim sulfatom. Potem smo dodali med 0,05 in 1,5 mL internega standarda za poliklorirane bifenile (PCB 30 in PCB 209) (Preglednica 11) s katerima smo izračunali izkoristek celotnega postopka določanja PCB oz. pesticidov. Nad vzorec v tulcu smo dodali nekaj steklene volne s katero smo preprečili uhajanje vzorca iz tulca. V enega od tulcev nismo dodali vzorca. Ta nam je služil kot slepa proba. Tkiva smo ekstrahirali s Soxhletovim aparatom. Ekstrakcija je potekala 16 ur s 130 mL heksana. Po končani ekstrakciji smo ekstrakte skoncentrirali v toku dušika na okoli 50 mL.

3.4.1.3 Odstranjevanje lipidov

Po končani ekstrakciji smo posamezne ekstrakte prelili v lije ločnike ter dodali od 10 do 12 mL 96 % žveplove (VI) kisline. Lije ločnike smo nekajkrat stresli in počakali, da se fazi ločita. Ker so v kislinski fazi lipidi, ki motijo pri analizi s plinsko kromatografijo, smo jo oddekantirali, vzorce pa prelili vsakega v svojo bučko. Ekstraktom smo dodali nekaj brezvodnega natrijevega sulfata s katerim smo odstranili morebitno kislino. Pri nekaterih ekstraktih se fazi nista dobro ločili, zato smo jih morali centrifugirati. Na koncu smo ekstrakte skoncentrirali v toku dušika na 1 mL.

3.4.1.4 Čiščenje/frakcionacija ekstraktov

Za čiščenje ekstraktov smo uporabili kolone s florisilom, katerega smo predhodno čistili s heksanom v Soxhlet aparatu (16 ur) in nato sušili 12 ur pri 130 °C. Dan pred uporabo smo florisil deaktivirali z vodo za kromatografijo (0,5 % ut), ki poveča njegovo adsorpcijsko učinkovitost. Pred polnjenem smo kolone spodaj zaprli s stekleno volno, s katero smo preprečili uhajanje florisila. Kolone smo polnili tako, da smo florisil omočili s heksanom. Pri tem smo pazili, da je bil florisil vedno omočen. Za posamezno kolono smo uporabili 18,5 g florisila. Po končanem polnjenju smo nad florisil dodali še približno 1 g brezvodnega natrijevega sulfata. Omenjene kolone omogočajo frakcionacijo različnih kloriranih spojin z uporabo različnih topil ali njihovih mešanic za eluiranje. Poleg PCB tako frakcionirajo tudi nekatere klorirane pesticide, kot npr. 4,4'-DDE.

Vzorce smo iz kolon, polnjenih s florisilom, eluirali s 65 mL heksana, nekatere vzorce tkiv iz Krupe pa smo eluirali s 85 mL heksana (Preglednica 11). Eluate, ki smo jih dobili z eluiranjem s 85 mL heksana, smo skoncentrirali v toku dušika na končni volumen 50 mL, prebavno cev na 60 mL, ostale pa na 1 mL.

Preglednica 11: Vzorci tkiv človeških ribic

Vzorec	Zatehta vzorca (g)	V in konc. internega standarda za PCB	V (mL) heksana za elucijo
KRUPA			
<i>P186 mišice (P186 M)</i>	0,46	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>P186 adipozno tkivo (P186 AT)</i>	0,56	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>P187 mišice (P187 M)</i>	0,47	1,5 mL (10 µg mL ⁻¹)	65
<i>P188 mišice (P188 M)</i>	0,52	1,5 mL (10 µg mL ⁻¹)	65
<i>P188 adipozno tkivo (P188 AT)</i>	0,52	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>P189 mišice (P189 M)</i>	0,56	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>P190 mišice (P190 M)</i>	0,49	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>jetra z žolčnikom vseh osebkov (J vsi)</i>	0,58	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>ledvica vseh osebkov (L vsi)</i>	0,14	1,5 mL (10 µg mL ⁻¹)	65
<i>prebavna cev s pankreasom vseh osebkov (P vsi)</i>	2,09	1,8 mL (10 µg mL ⁻¹)	65
<i>visceralno maščevje vseh osebkov (VM vsi)</i>	0,17	1,5 mL (10 µg mL ⁻¹)	65
OTOVSKI BREG			
<i>P159 mišice (P159 M)</i>	0,35	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>P160 mišice (P160 M)</i>	1,18	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>P161 mišice (P161 M)</i>	0,81	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>jetra P159, P160 in P161 (J P159, P160, P161)</i>	0,98	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>adipozno tkivo P160 in P161 (AT 160, 161)</i>	0,26	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
PLANINSKA JAMA			
<i>P164 mišice (P164 M)</i>	0,78	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>jetra P144, P145 in P164 (J P144, P145, P164)</i>	0,12	20 µL (1 µg mL ⁻¹)	65

3.4.2 Sedimenti

Priprava vzorcev sedimentov za analizo se le malo razlikuje od priprave tkiv. V naslednjih poglavjih so navedena samo odstopanja od zgoraj opisanega postopka (Poglavje 3.4.1).

3.4.2.1 Sušenje in homogenizacija

Vzorci sedimentov smo sušili pri sobni temperaturi, potem smo jih homogenizirali in presejali skozi 62 µm sito. Tako pripravljene sedimente smo do ekstrakcije shranili v hladilniku (~ 5 °C).

3.4.2.2 Ekstrakcija

Sedimente smo ekstrahirali s Soxhletovo aparaturo 16 ur s 130 mL mešanice heksana in diklorometana v razmerju 1:1 (v/v).

3.4.2.3 Odstranjevanje žvepla

Odstranjevanje žvepla iz ekstraktov sedimentov je potrebno, ker žveplo moti pri analizi s plinsko kromatografijo. Za odstranjevanje smo uporabili predhodno čiščen in reduciran baker v prahu. V erlenmajerico smo dali bakrov prah ter ga aktivirali s 30 % klorovodikovo kislino v ultrazvočni kopeli (15 min). Po tem času smo kislino oddekanirali in postopek ponovili trikrat. Po končani kislinski obdelavi, smo baker sprali z destilirano vodo do pH 6 - 7. Sledilo je čiščenje kislinsko obdelanega bakra z acetonom. Baker smo skupaj z acetonom ekstrahirali v ultrazvočni kopeli 10 min. Nato smo aceton oddekanirali in nalili novega. Ves postopek čiščenja z acetonom smo ponovili tri- do štirikrat oz. dokler ni bil aceton povsem brezbarven. Zadnjo acetonsko fazo smo oddekanirali ter v erlenmajerico dodali malo heksana, da se je zmešal z acetonom. Ponovno smo oddekanirali topili in nalili nov heksan ter ponovno ekstrahirali v ultrazvočni kopeli 10 min. Po kopeli smo heksan nadomestili z novim. Ekstraktom sedimentov smo dodali tako pripravljen baker in jih pustili čez noč na sobni temperaturi, da se je žveplo vezalo na baker. Naslednji dan smo ekstrakte skoncentrirali v toku dušika na okoli 1 mL.

3.4.2.4 Čiščenje/frakcionacija ekstraktov

Za čiščenje ekstraktov smo pripravili enake kolone s florisilom kot za tkiva. Vzorce smo eluirali s 65 mL heksana oz. nekatere vzorce sedimentov iz Krupe s 85 mL heksana (Preglednica 12). Eluate, ki smo jih dobili iz sedimentov iz Krupe, smo skoncentrirali v toku dušika na končni volumen 50 mL, ostale pa na 1 mL.

Preglednica 12: Vzorci sedimentov

Vzorec	Zatehta vzorca (g)	V in konc. internega standarda za PCB	V (mL) heksana za elucijo
<i>plitvina I</i>	2,32	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>plitvina II</i>	2,57	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>desni breg</i>	2,47	1 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>levi breg</i>	6,53	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>dno_D</i>	5,09	40 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>dno_S</i>	7,23	0,5 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>dno_L</i>	3,19	0,2 mL (10 µg mL ⁻¹)	85
<i>potok</i>	5,37	50 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>Vodenica</i>	5,03	40 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>Lebica</i>	4,79	40 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>Otovski breg</i>	5,11	20 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>Pivški rokav</i>	5,5	20 µL (1 µg mL ⁻¹)	65
<i>vhod Pl. jama</i>	4,97	20 µL (1 µg mL ⁻¹)	65

3.5 DOLOČANJE PCB IN 4,4'-DDE V VZORCIH

3.5.1 GC-ECD analiza

Vzorke smo analizirali s plinskim kromatografom sklopljenim z detektorjem na zajetje elektronov (GC-ECD), HP 6890 Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija, na kapilarni koloni DB-XLB dolžine 30 metrov, notranjim premerom 0,25 mm in debelino stacionarne faze 0,25 µm (polisiloksan polimer). GC ločba je potekala pod naslednjimi delovnimi pogoji:

- nosilni plin: helij
- hitrost nosilnega plina (velocity): 28 cm s⁻¹ pri 100 °C, konstantna
- temperatura injektorja: 250 °C, »Cool On-Column«
- volumen injiciranega vzorca: 1 µL
- temperatura detektorja: 320 °C
- temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa je prikazan v

Preglednici 13

Preglednica 13: Temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa GC-ECD

začetna T	hitrost naraščanja T	končna T	trajanje
100 °C	-	100 °C	1 min
100 °C	10 °C min ⁻¹	300 °C	20 min
300 °C	-	300 °C	9 min
skupaj			30 min

V vzorcih smo analizirali osem PCB: PCB 28, 31, 52, 101, 118, 153, 138, in 180 ter 4,4'-DDE.

3.5.2 Potrditev identitete PCB in 4,4'-DDE

Z GC-ECD ne moremo z gotovostjo potrditi identitete PCB in 4,4'-DDE. Zaradi visokih vsebnosti PCB v preiskovanih vzorcih smo identiteto PCB lahko potrdili s plinskim kromatografom z masno selektivnim detektorjem (GC-MSD), HP 6890 Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija, na kapilarni koloni DB-5MS dolžine 30 metrov, notranjim premerom 0,25 mm in debeline stacionarne faze 0,25 µm (5 % fenil metilpolisiloksan). GC-MSD ločba je potekala z izbranimi ioni (SIM način - single ion monitoring) pod naslednjimi delovnimi pogoji:

- nosilni plin: helij
- hitrost nosilnega plina (velocity): 49 cm s⁻¹ pri 40 °C, konstantna
- temperatura injektorja: 250 °C, »Splitless«
- volumen injiciranega vzorca: 1 µL
- temperatura vmesnika: 280 °C
- temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa je prikazan v Preglednici 14
- način ionizacije: ionizacija z elektroni (EI)
- energija ionizacija: 70 eV

Preglednica 14: Temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa GC-MSD

začetna T	hitrost naraščanja T	končna T	trajanje
40 °C	-	40 °C	1 min
40 °C	20 °C min ⁻¹	180 °C	4 min
180 °C	10 °C min ⁻¹	280 °C	10 min
			skupaj 25 min

Identiteto 4,4'-DDE smo potrdili z metodo standardnega dodatka. Vzorcem, v katerih smo predhodno določili 4,4'-DDE, smo dodali standard ter jih še enkrat analizirali z GC-ECD. S sorazmernim povišanjem kromatografskega vrha, značilnega za 4,4'-DDE, smo potrdili njegovo identiteto.

3.5.3 Linearnost analizne metode

Linearnost analizne metode smo preverili tako, da smo pripravili raztopine standardov osmih izbranih PCB v heksanu v koncentracijskem območju od 0,5 do 1000 ng mL⁻¹ za PCB oz. od 1 do 700 ng mL⁻¹ za 4,4'-DDE ter jih analizirali z GC-ECD. Z metodo linearne regresije smo določili umeritveno premico za vsak izbran PCB in 4,4'-DDE. Vzorce, pri katerih je koncentracija analitov presegla 1000 ng mL⁻¹ oz. 700 ng mL⁻¹, smo razredčili tako, da so bili znotraj koncentracijskega območja.

3.5.4 Meje zaznavnosti in meje določljivosti

Meja zaznavnosti instrumenta (IDL - Instrument Detection Limit) predstavlja najnižjo koncentracijo spojine, ki jo lahko identificiramo oz. izmerimo z instrumentom (plinskim kromatografom), ni pa primerna za kvantifikacijo. Meja določljivosti instrumenta (IQL - Instrument Quantification Limit) je parameter, ki opisuje najnižjo koncentracijo spojine, ki jo lahko kvantitativno določimo (Knoll, 1985). Za določitev mej smo analizirali tri vzorce mišičnega tkiva modroplavutega tuna (*Thunnus thynnus*) in tri vzorce sedimenta, ki niso bili kontaminirani z izbranimi osmimi PCB in 4,4'-DDE. Vzorce za analizo smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.4.1 za tkivo oz. 3.4.2 za sediment. Iz površine vrhov v slepih vzorcih, ki so se pojavili pri retencijskih časih preiskovanih PCB kongenersov, smo

določili standardno deviacijo. IDL smo izračunali kot trikratno, IQL pa kot desetkratno vrednost standardne deviacije sipanja signala.

Mejo zaznavnosti (MDL - Method Detection Limit) in mejo določljivosti (MQL - Method Quantification Limit) metode smo izračunali tako, da smo IDL oz. IQL delili s povprečno suho težo treh slepih vzorcev. MDL nam pove najnižjo koncentracijo spojine v vzorcih po opravljenem celotnem postopku določanja PCB, ki jo lahko identificiramo z instrumentom oz. plinskim kromatografom. MQL pa je najnižja koncentracija spojine, ki jo lahko kvantitativno ovrednotimo (Kroll, 1985).

Po enakem postopku smo določili meje zaznavnosti oz. določljivosti za 4,4'-DDE.

3.5.5 Izkoristek postopka določanja PCB

Izkoristek celotnega postopka določanja PCB v vzorcih smo izračunali na podlagi odzivov internih standardov, PCB 30 in PCB 209, v posameznem vzorcu in izmerjenih koncentracij internih standardov:

$$\text{izkoristek PCB 30 oz. 209 (\%)} = \frac{\text{površina IS v vzorcu}}{\text{površina izmerjenega IS}} \cdot 100 \quad \dots (4)$$

Nato smo oba izkoristka, za PCB 30 in PCB 209, sešteli ter delili z dve in dobili izkoristek, ki smo ga upoštevali pri nadaljnjih izračunih.

4 REZULTATI

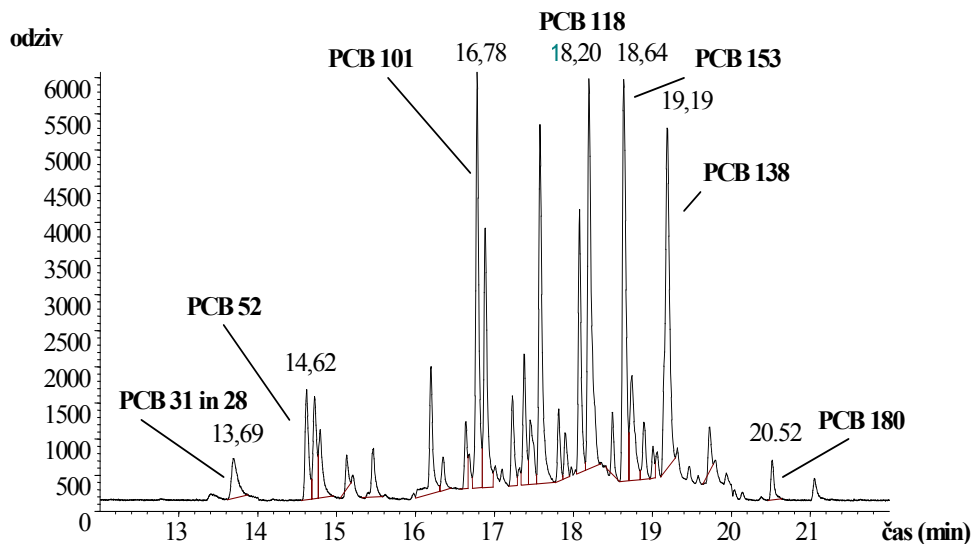
Pri sekciji živali nismo opazili vidnih morfoloških sprememb telesa oz. organov. Osebki iz izvira reke Krupe so bili temnejše pigmentirani, v primerjavi z osebki iz drugih lokalitet.

Pri analiziranju tkiv človeških ribic iz Otovskega brega in Planinske jame smo opazili izstopajoči kromatografski vrh (Slika 26). Z metodo standardnega dodatka v vzorcu skeletnih mišic osebka P159, smo dokazali, da gre za 4,4'-DDE (Slika 27). Ta metoda sicer ni tako zanesljiva kot GC-MS ali GC-MS/MS, lahko pa z večjo gotovostjo trdimo, da gre res za iskano spojino. Nato smo 4,4'-DDE določili tudi v vzorcih sedimentov omenjenih lokalitet. Zato v rezultatih poleg vsebnosti PCB podajamo tudi vsebnost 4,4'-DDE, razen v vzorcih iz območja reke Krupe, kjer se njegov retencijski čas prekriva z retencijskim časom nekaterih PCB v tehničnih mešanicah.

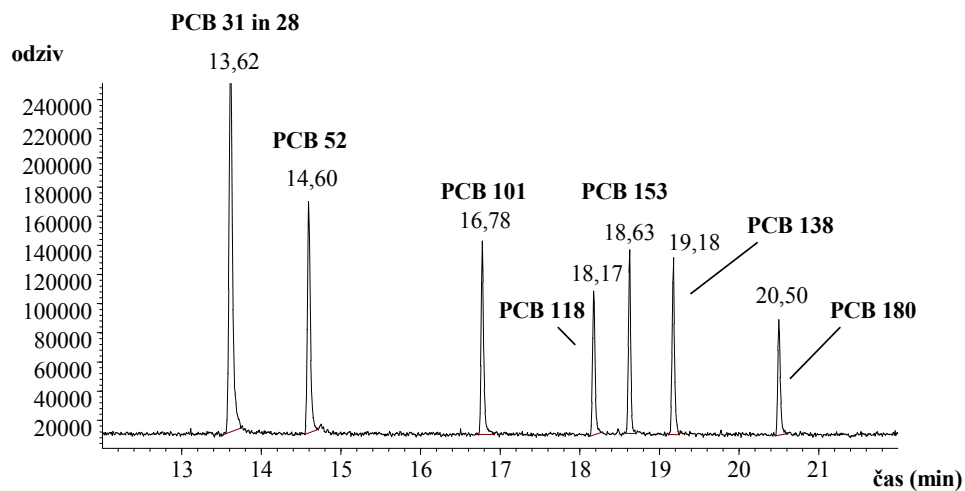
4.1 POTRDITEV IDENTITETE PCB IN 4,4'-DDE

Na Slikah 19 do 27 so prikazani izseki kromatogramov (GC-MSD in GC-ECD). Na njih vidimo odzive izbranih PCB v vzorcih tkiv (*P188 AT* in *P159 M*) in sedimenta iz izvira Krupe (*dno_L*), v standardni raztopini izbranih PCB (MIX21) in v standardnih raztopinah tehničnih mešanic Aroclor 1242 in 1254. Na kromatogramu (GC-ECD) vzorca skeletnih mišic osebka P159 iz Otovskega brega vidimo, poleg odzivov izbranih PCB, še odziv za 4,4'-DDE (Slika 26 in 27). Uporabljeni standardni raztopini tehničnih mešanic, za pomoč pri identifikaciji PCB v vzorcih (Sliki 24 in 25), sta bili izbrani zato, ker sta po vsebnosti zvrsti PCB podobni tehničnim mešanicam, ki so jih uporabljali v proizvodnji kondenzatorjev v tovarni Iskra v Semiču, Clophen A30 in A50 ter Pyralene 1500.

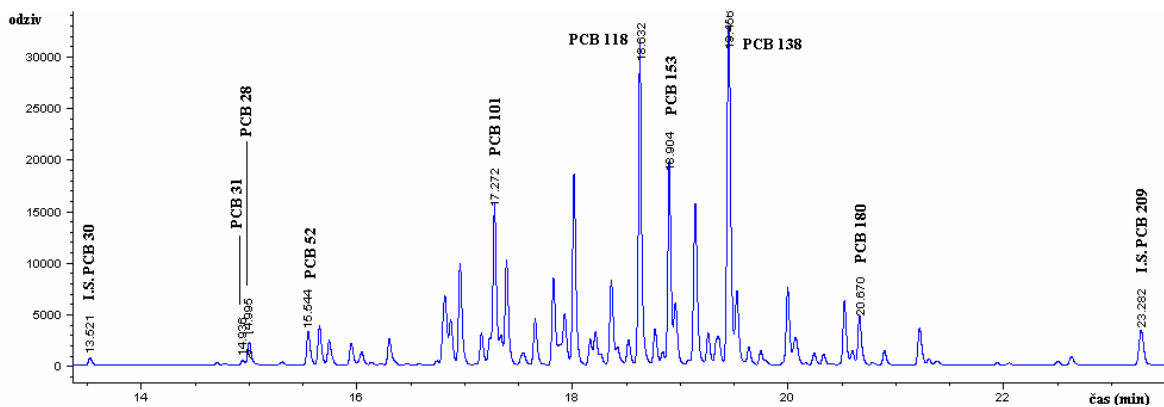
Izbrani primeri kromatogramov vzorcev kažejo tipične kromatografske vrhove za PCB oz. 4,4'-DDE. Na Sliki 19 je prikazan izsek kromatograma (GC-MSD) vzorca adipoznega tkiva osebka P188 iz izvira Krupe, ki je imel največjo vsebnost PCB. Na Sliki 20 pa izsek kromatograma (GC-MSD) standardne raztopine izbranih PCB (MIX21). S primerjavo retencijskih časov in izbranih ionov potrdimo identiteto PCB. Enako naredimo s primerjavo retencijskih časov kromatogramov (GC-ECD).



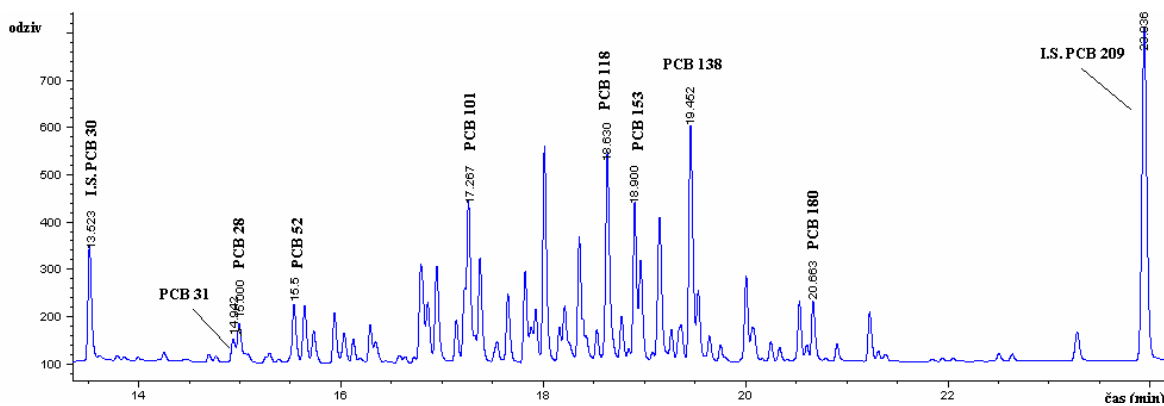
Slika 19: Izsek kromatograma (GC-MSD) vzorca adipoznega tkiva osebnika P188 iz izvira Krupe (*P188 AT*)



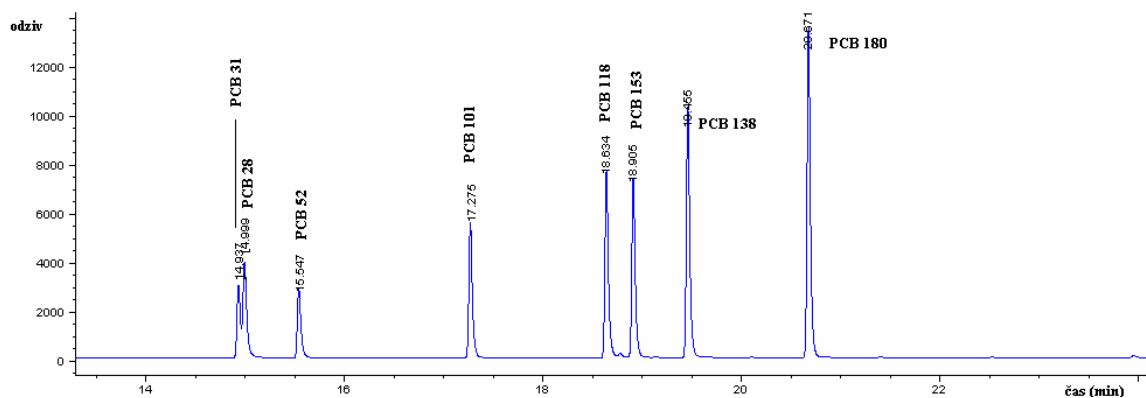
Slika 20: Izsek kromatograma (GC-MSD) standardne raztopine indikatorskih PCB (MIX21)



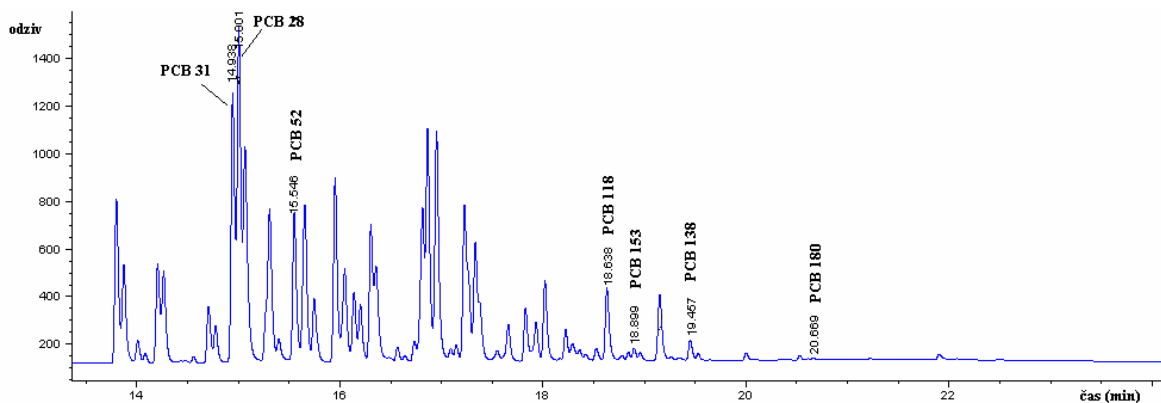
Slika 21: Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca adipoznega tkiva oseba P188 iz izvira Krupe (*P188 AT*)



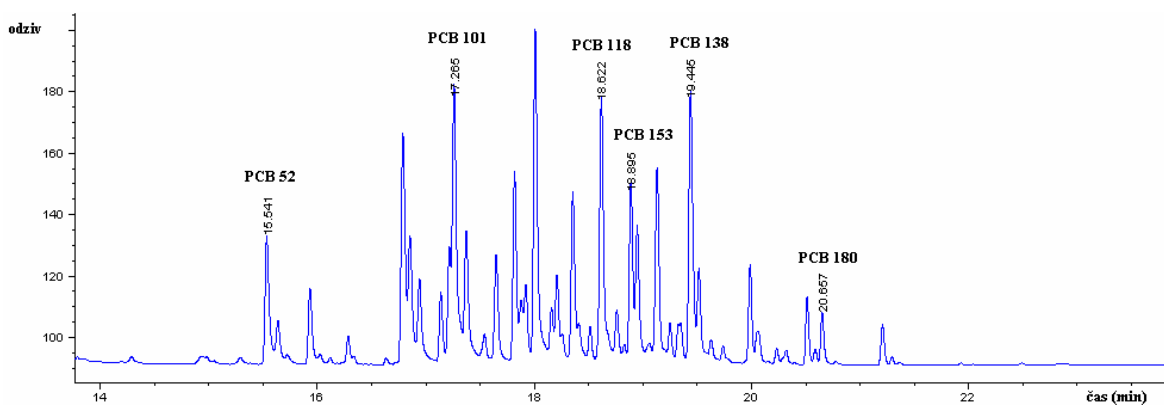
Slika 22: Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca sedimentov iz izvira Krupe (*dno_L*)



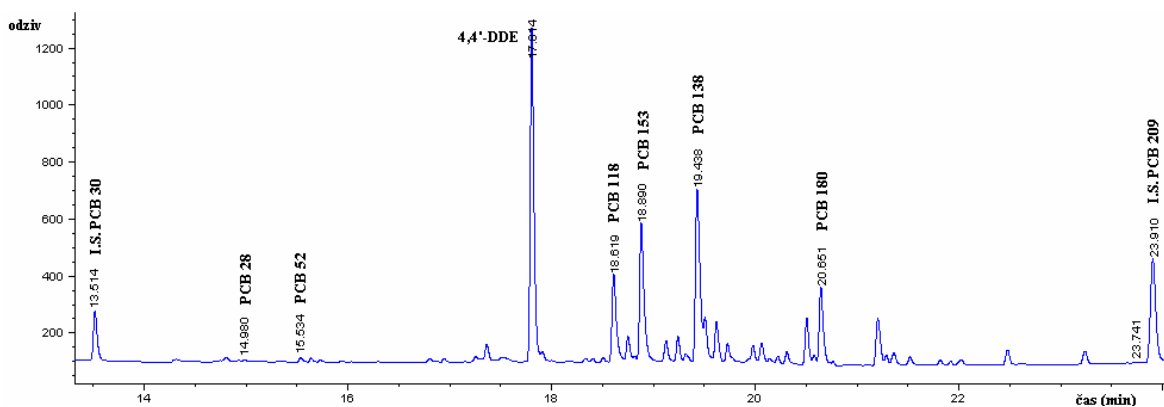
Slika 23: Izsek iz kromatograma (GC-ECD) standardne raztopine indikatorskih PCB (MIX21)



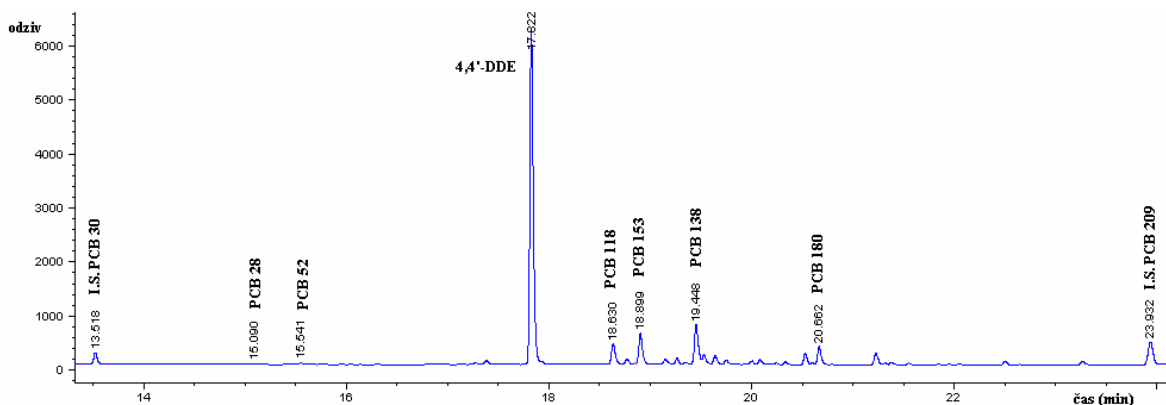
Slika 24: Izsek kromatograma (GC-ECD) standardne raztopine tehnične mešanice Aroclor 1242



Slika 25: Izsek kromatograma (GC-ECD) standardne raztopine tehnične mešanice Aroclor 1254



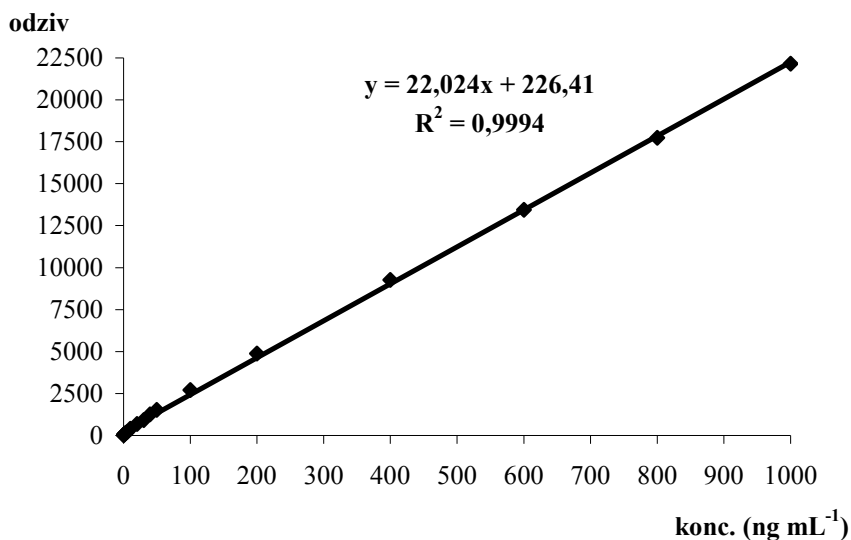
Slika 26: Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca skeletnih mišic osebk P159 iz Otovskega brega (*P159 M*)



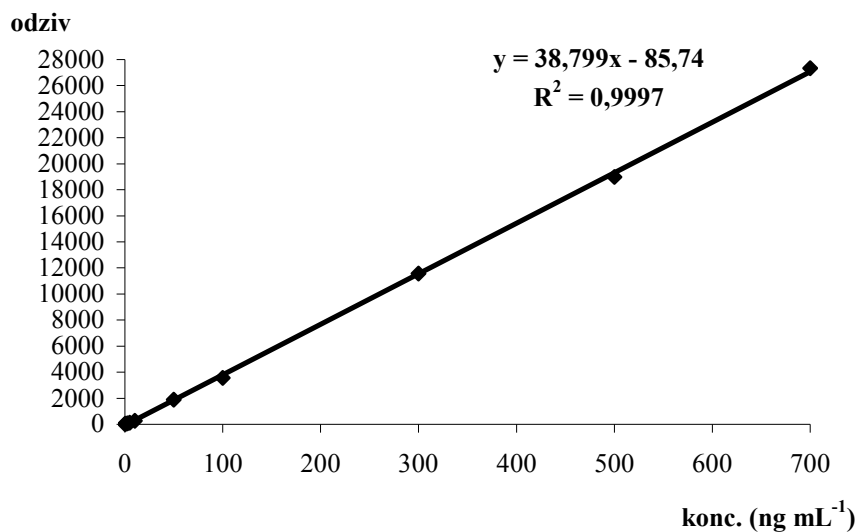
Slika 27: Izsek kromatograma (GC-ECD) vzorca skeletnih mišic osebk P159 iz Otovskega brega (*P159 M*) z dodatkom standardne raztopine za 4,4'-DDE

4.2 LINEARNOST ANALIZNE METODE

Linearnost je bila pri vseh izbranih PCB zelo dobra, saj se je vrednost korelacijskega koeficienta R^2 gibala med 0,9958 in 0,9997 (Slika 28). Podobno velja za 4,4'-DDE (Slika 29).



Slika 28: Umeritvena krivulja za PCB 153



Slika 29: Umeritvena krivulja za 4,4'-DDE

4.3 MEJE ZAZNAVNOSTI IN MEJE DOLOČLJIVOSTI

V Preglednicah 15 in 16 so podane izračunane vrednosti meje zaznavnosti instrumenta (IDL) in metode (MDL) ter meje določljivosti instrumenta (IQL) in metode (MQL) za osem izbranih PCB in 4,4'-DDE v mišičnem tkivu modroplavutega tuna in sedimentu.

Preglednica 15: Meja zaznavnosti instrumenta (IDL) in metode (MDL) ter meja določljivosti instrumenta (IQL) in metode (MQL) za sedem indikatorskih PCB in 4,4'-DDE v mišičnem tkivu modroplavutega tuna (*Thunnus thynnus*)

PCB	IDL (ng mL ⁻¹)	MDL (ng g ⁻¹)	IQL (ng mL ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
31	0,09	0,03	0,32	0,09
28	0,09	0,03	0,31	0,09
52	0,14	0,04	0,47	0,14
101	0,14	0,04	0,46	0,14
118	0,13	0,04	0,42	0,12
153	0,10	0,03	0,34	0,10
138	0,06	0,02	0,19	0,05
180	0,11	0,03	0,37	0,11
4,4'-DDE	0,26	0,08	0,88	0,26

Preglednica 16: Meja zaznavnosti instrumenta (IDL) in metode (MDL) ter meja določljivosti instrumenta (IQL) in metode (MQL) za sedem indikatorskih PCB in 4,4'-DDE v sedimentu

PCB	IDL (ng mL ⁻¹)	MDL (ng g ⁻¹)	IQL (ng mL ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
31	0,02	0,004	0,07	0,01
28	0,12	0,02	0,41	0,08
52	0,12	0,02	0,41	0,08
101	0,14	0,03	0,48	0,09
118	0,14	0,03	0,46	0,08
153	0,12	0,02	0,40	0,07
138	0,15	0,03	0,49	0,09
180	0,11	0,02	0,36	0,07
4,4'-DDE	0,19	0,03	0,62	0,11

4.4 IZKORISTEK POSTOPKA DOLOČANJA PCB

Izkoristki postopka priprave vzorcev, od ekstrakcije naprej, za GC-ECD analizo za posamezen vzorec so bili v povprečju 59,0 % za tkiva (med 18 in 96,0 %) ter 68,9 % za sedimente (med 42,0 in 99,4 %). Velik razpon v vrednostih izkoristkov lahko pripišemo uporabi dveh različnih volumnov topila (65 in 85 mL) za eluiranje s kolon pri čiščenju/frakcionaciji ekstraktov ter nato različnemu skoncentriranju na končni volumen (50 oz. 1 mL). V Preglednici 17 so podani izkoristki za vse analizirane vzorce.

Preglednica 17: Izkoristki postopka priprave vzorcev, od ekstrakcije naprej, za GC-ECD analizo

Vzorec	Izkoristek (%)
OBMOČJE KRUPE	
<i>Tkiva</i>	
<i>mišice P186 (P186 M)</i>	91,3
<i>mišice P187 (P187 M)</i>	56,3
<i>mišice P188 (P188 M)</i>	63,3
<i>mišice P189 (P189 M)</i>	82,4
<i>mišice P190 (P190 M)</i>	85,5
<i>adipozno tkivo P186 (P186 AT)</i>	95,8
<i>adipozno tkivo P188 (P188 AT)</i>	83,9
<i>jetra vseh osebkov (J vsi)</i>	66,6
<i>ledvica vseh osebkov (L vsi)</i>	59,6
<i>prebavna cev vseh osebkov (P vsi)</i>	74,9
<i>visceralno maščevje vseh osebkov (VM vsi)</i>	67,8
<i>Sedimenti</i>	
<i>desni breg</i>	78,9
<i>levi breg</i>	42,0
<i>dno_D</i>	55,8
<i>dno_S</i>	56,6
<i>dno_L</i>	99,4
<i>plivina I</i>	78,2
<i>plivina II</i>	82,8
<i>potok</i>	56,5
<i>Vodenica</i>	78,3
<i>Lebica</i>	85,4
OTOVSKI BREG	
<i>mišice P159 (P159 M)</i>	39,0
<i>mišice P160 (P160 M)</i>	25,7
<i>mišice P161 (P161 M)</i>	40,8
<i>jetra P159, P160 in P161 (J P159, P160, P161)</i>	34,3
<i>adipozno tkivo P160 in P161 (AT 160, 161)</i>	52,2
<i>Otovski breg</i>	57,7
PLANINSKA JAMA	
<i>mišice P164 (P164 M)</i>	23,4
<i>jetra P144, P145 in P164 (J P144, P145, P164)</i>	18,8
<i>Pivški rokav</i>	57,6
<i>vhod Pl. jama</i>	66,6

4.5 VSEBNOST PCB IN 4,4'-DDE V ČLOVEŠKIH RIBICAH

Koncentracije posameznih kongenersov in 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic smo izračunali iz umeritvenih krivulj. Pri tem smo upoštevali izkoristek postopka priprave vzorcev za GC-ECD analizo. Dobljene koncentracije smo preračunali na suho težo vzorca. Podane so v Preglednicah 18 in 19 ter na Slikah 30 do 33. Na Sliki 34 so prikazani deleži posameznih kongenersov v vseh analiziranih tkivih človeških ribic.

Preglednica 18: Koncentracije izbranih PCB kongenersov in njihova vsota ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz izvira reke Krupe

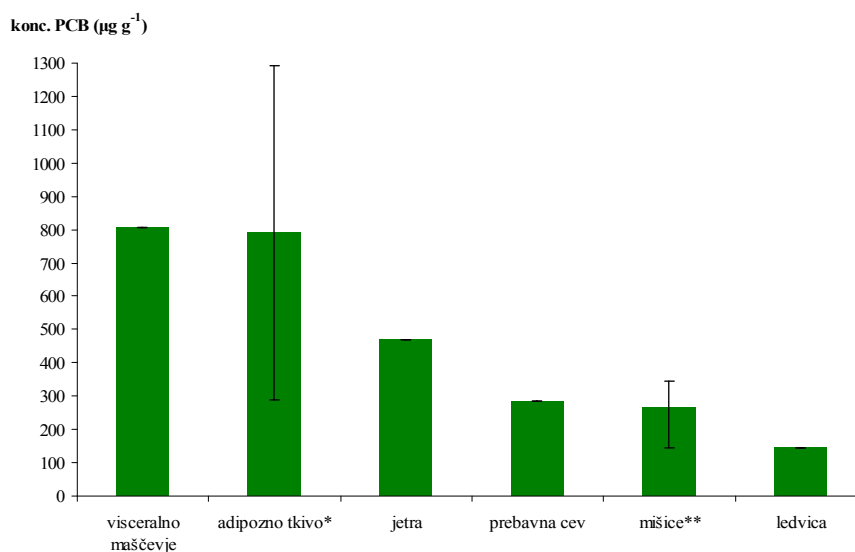
tkivo	28	31	52	101	118	138	153	180	vsota*
<i>P186 M</i>	11,9	5,21	26,6	59,9	41,9	33,9	43,5	4,38	222
<i>P187 M</i>	22,1	11,0	76,6	86,5	47,6	47,2	31,1	4,34	316
<i>P188 M</i>	14,9	6,92	36,5	76,7	54,0	61,1	49,8	6,21	299
<i>P189 M</i>	7,51	4,37	19,3	38,3	29,0	25,8	22,4	2,28	145
<i>P190 M</i>	14,8	6,20	30,9	80,1	71,9	70,0	71,1	7,99	347
<i>P186 AT</i>	11,9	4,09	28,1	71,0	77,2	52,9	41,9	6,40	289
<i>P188 AT</i>	61,4	16,9	132	301	289	212	256	39,2	1291
<i>VM vsi</i>	34,1	10,8	86,6	207	150	185	126	19,3	808
<i>J vsi</i>	26,7	9,13	59,9	112	84,5	115	65,3	8,20	471
<i>L vsi</i>	4,28	1,90	17,6	38,7	27,1	33,0	20,9	3,19	145
<i>P vsi</i>	13,4	3,77	32,1	72,0	52,2	68,1	41,6	6,36	286

*vsota PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180.

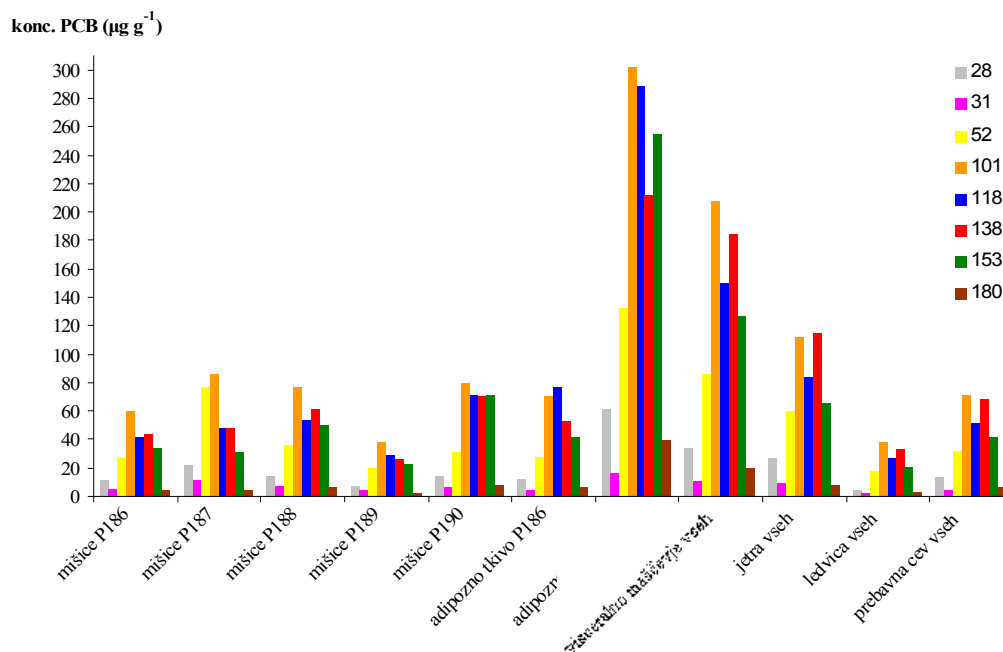
Preglednica 19: Koncentracije izbranih PCB kongenersov in njihova vsota ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) ter 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz Otovskega brega in Planinske jame (a ... pod mejo določljivosti)

tkivo	28	31	52	101	118	138	153	180	vsota*	4,4'-DDE
OTOVSKI BREG										
<i>P159 M</i>	0,08	a	0,01	a	0,23	0,46	0,50	0,14	1,34	0,53
<i>P160 M</i>	0,07	0,46	0,16	0,38	0,38	0,39	0,39	0,05	1,83	1,61
<i>P161 M</i>	0,06	0,04	0,10	0,17	0,96	0,93	0,94	0,22	3,38	3,37
<i>J P159, P160, P161</i>	0,06	a	0,06	0,06	0,41	0,60	0,43	0,11	1,72	1,12
<i>AT 160, 161</i>	0,22	a	0,31	0,33	1,32	1,50	1,29	0,30	5,27	4,29
PLANINSKA JAMA										
<i>P164 M</i>	0,30	0,14	0,43	0,24	0,51	1,29	1,40	0,70	4,86	5,87
<i>J P144, P145, P164</i>	0,89	a	1,23	0,21	0,65	1,73	1,70	0,82	7,23	5,46

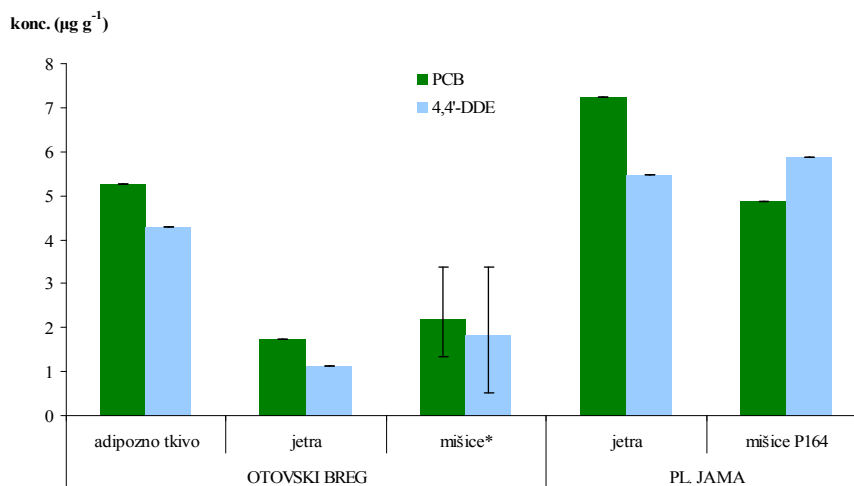
*vsota PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180.



Slika 30: Koncentracija PCB ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz izvira reke Krupe (* podana je povprečna koncentracija PCB v adipoznem tkivu dveh osebkov s prikazano najvišjo in najnižjo koncentracijo; ** podana je povprečna koncentracija PCB v mišicah petih osebkov s prikazano najvišjo in najnižjo koncentracijo v mišici)



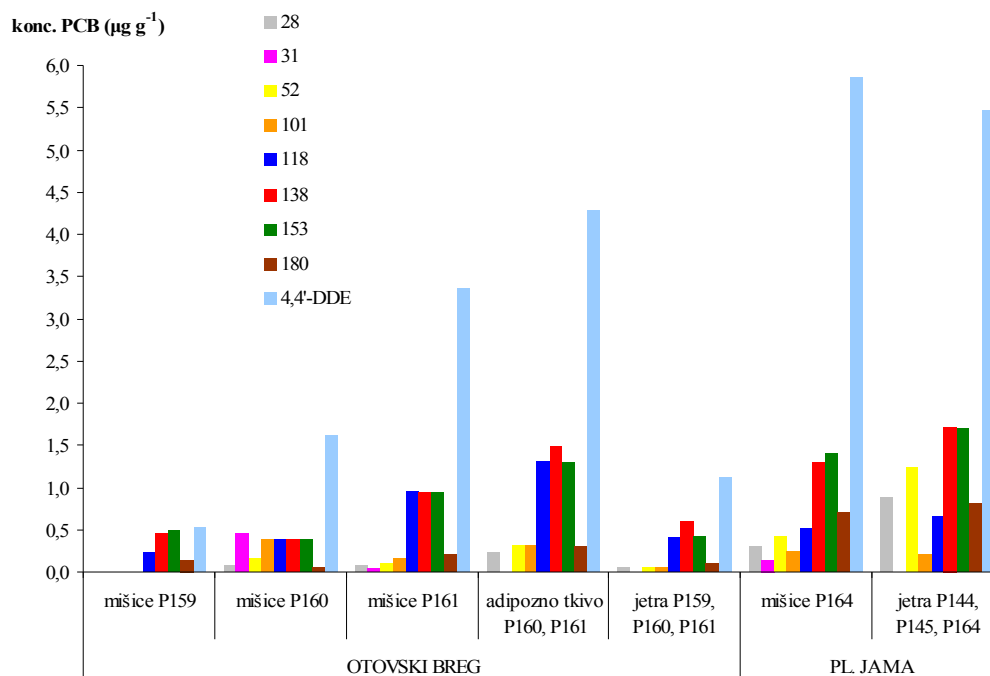
Slika 31: Koncentracije izbranih PCB kongenersov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz izvira reke Krupe



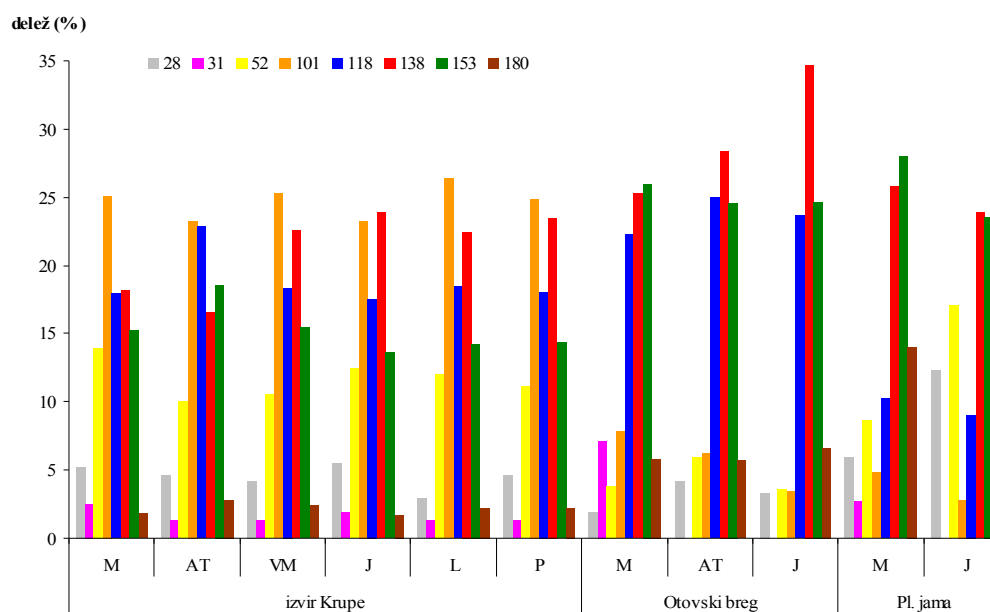
Slika 32: Koncentracija PCB in 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz referenčnih lokalitet (* podana je povprečna koncentracija PCB v mišicah treh osebkov s prikazano najvišjo in najnižjo koncentracijo v mišici)

Iz povprečnih koncentracij PCB določenih v tkivih sklepamo, da se največ PCB akumulira v visceralnem maščevju in adipoznem tkivu, nato v jetrih in mišicah. Najnižje povprečne

koncentracije dobimo v prebavni cevi in ledvicah. Tak trend je značilen ne glede na lokaliteto (Sliki 30 in 32).



Slika 33: Koncentracije izbranih PCB kongenersov in 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus anguinus*) iz referenčnih lokalitet



Slika 34: Delež izbranih PCB kongenersov v vseh analiziranih tkivih človeških ribic (*Proteus anguinus*) (M - mišice, AT - adipozno tkivo, VM - visceralno maščevje, J - jetra, L - ledvica, P - prebavna cev)

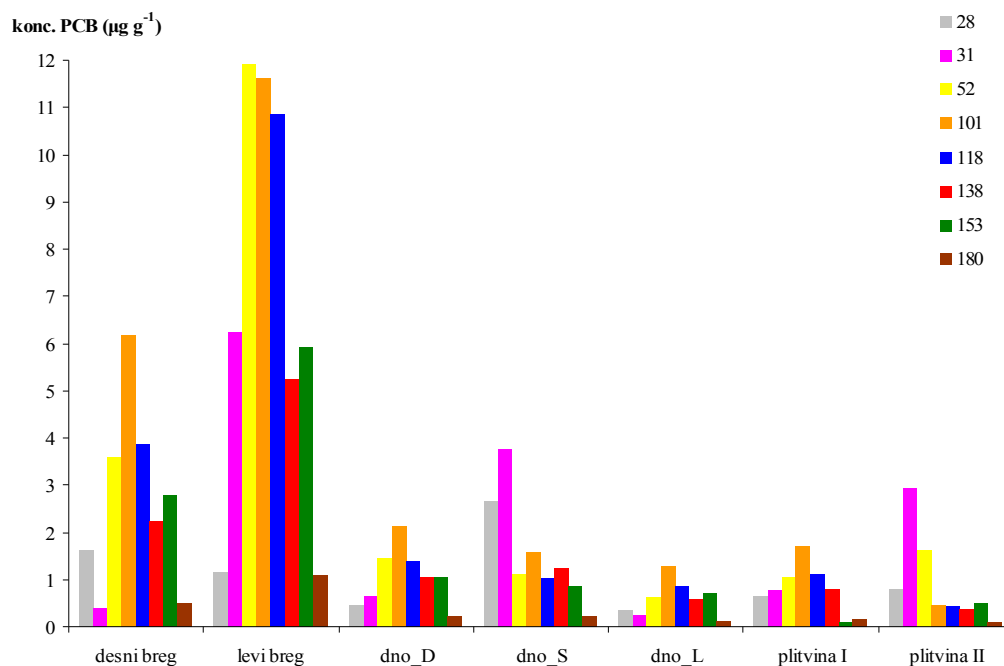
4.6 VSEBNOST PCB IN 4,4'-DDE V SEDIMENTIH

Koncentracije posameznih kongenersov in 4,4'-DDE smo izračunali iz umeritvenih krivulj. Pri tem smo upoštevali izkoristek postopka priprave vzorce za GC-ECD analizo. Dobljene koncentracije smo preračunali na suho težo vzorca. Podane so v Preglednici 20 ter na Slikah 35 in 36. Na Sliki 37 so prikazani deleži posameznih kongenersov v sedimentih vzorčevalnih mest.

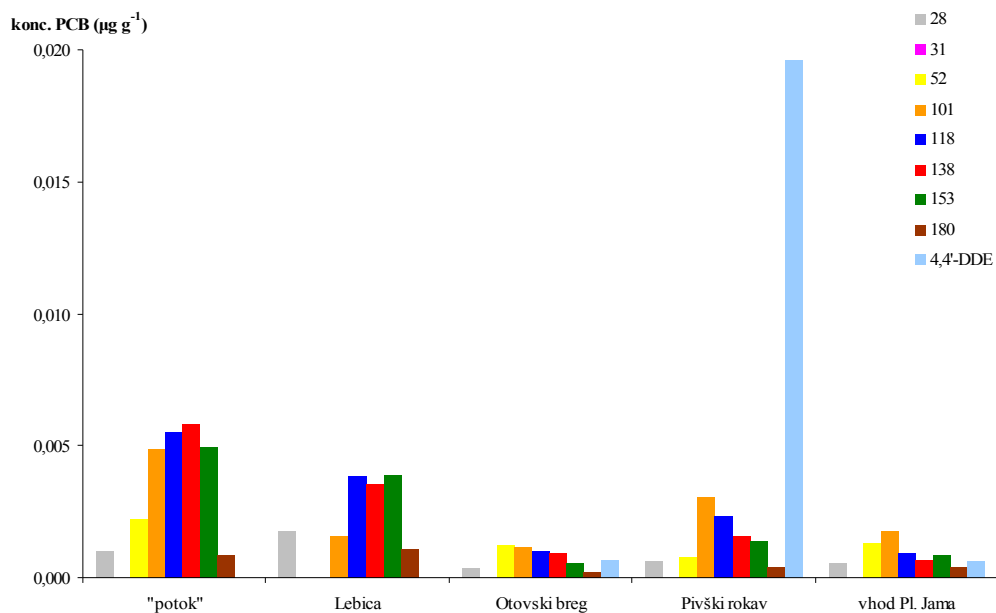
Preglednica 20: Koncentracije izbranih PCB kongenersov in njihova vsota ter 4,4-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v sedimentih (/ ... nismo določali; a ... pod mejo določljivosti)

sediment	28	31	52	101	118	138	153	180	vsota*	4,4-DDE
<i>desni breg</i>	1,62	0,417	3,60	6,18	3,87	2,22	2,78	0,482	20,8	/
<i>levi breg</i>	1,15	6,24	11,9	11,6	10,9	5,24	5,92	1,08	47,8	/
<i>dno_D</i>	0,480	0,649	1,46	2,14	1,39	1,07	1,06	0,212	7,81	/
<i>dno_S</i>	2,66	3,77	1,12	1,59	1,02	1,25	0,853	0,218	8,71	/
<i>dno_L</i>	0,351	0,239	0,633	1,26	0,875	0,582	0,720	0,131	4,56	/
<i>plitvina I</i>	0,639	0,78	1,04	1,70	1,12	0,792	0,095	0,157	5,55	/
<i>plitvina II</i>	0,801	2,93	1,60	0,463	0,424	0,357	0,487	0,097	4,23	/
<i>potok</i>	0,001	a	0,002	0,005	0,006	0,006	0,005	0,001	0,025	/
<i>Lebica</i>	0,002	a	a	0,002	0,004	0,004	0,004	0,001	0,020	/
<i>Otovski breg</i>	0,0003	a	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,0002	0,005	0,001
<i>Pivški rokav</i>	0,0006	a	0,001	0,003	0,002	0,002	0,001	0,0004	0,010	0,020
<i>vhod Pl. jama</i>	0,0006	a	0,001	0,002	0,001	0,0006	0,001	0,0004	0,006	0,001

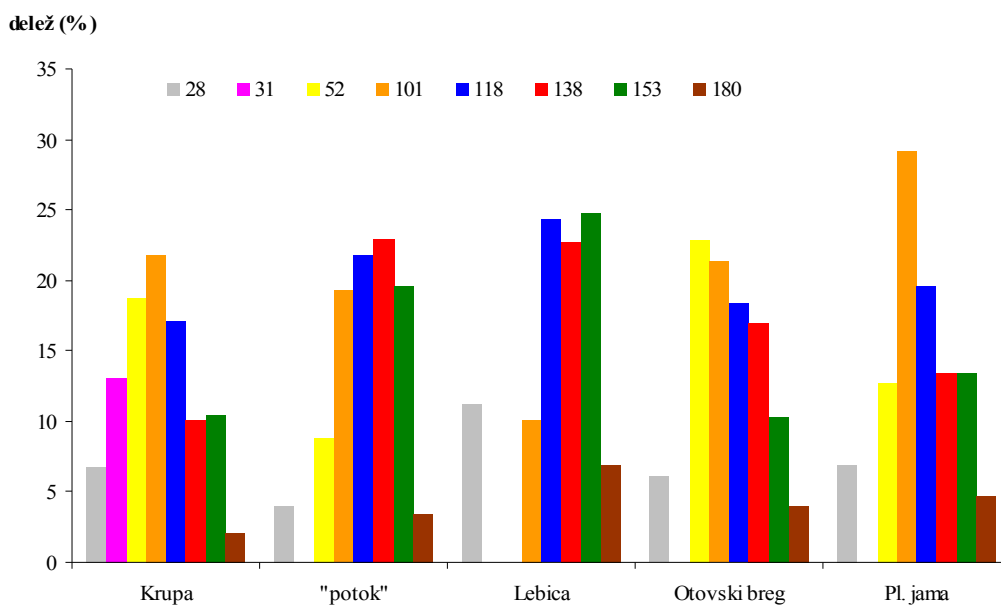
*vsota PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 in 180.



Slika 35: Koncentracije izbranih PCB kongenersov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v sedimentih reke Krupe



Slika 36: Koncentracije izbranih PCB kongenersov in 4,4'-DDE ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) v sedimentih ostalih vzorčevalnih mest



Slika 37: Delež izbranih PCB kongenersov v sedimentih reke Krupe, vzorčevalnega mesta 'potok', jame Lebice, Otovskega brega in Planinske jame

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo določali vsebnost izbranih PCB in 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic in sedimentih iz izbranih lokacij. Območje reke Krupe smo izbrali zaradi znanega in dobro preiskovanega onesnaženja njenega zaledja s PCB. Otovski breg in Planinska jama, kot znani slovenski lokaliteti pojavljanja človeških ribic, sta bili izbrani za referenčni vzorčevalni mesti.

Privzem in razporejanje PCB v človeških ribicah nista poznana. Vnos verjetno poteka podobno kot pri drugih vodnih organizmih skozi škrge, kožo in prebavila s kontaminirano hrano (Shaw in Connel, 1986). Za mlade človeške ribice, kot tudi za druge jamske živali, je značilna geofagija (požiranje jamske ilovice) (Vandel, 1965). Tudi odrasle človeške ribice ob grabljenju plena običajno zajamejo nekaj ilovice. PCB lahko prehajajo preko samic v jajca (Kadokami in sod., 2004) oz. se nalagajo že v času embrionalnega in larvalnega razvoja dvoživk (de Solla, 2002; Gutleb, 1999; Jofre, 2008).

Vsebnost PCB v tkivih človeških ribic iz izvira Krupe je mnogo višja v primerjavi z osebki iz Otovskega brega (v povprečju 155-krat višja) in Planinske jame (v povprečju 74-krat višja). Zanimivo je, da so koncentracije PCB v tkivih osebkov iz Otovskega brega v povprečju 2-krat nižje od tistih iz Planinske jame. Pričakovali bi ravno obratno, saj je Otovski breg veliko bližje reki Krupi oz. viru onesnaženja. Znano je, da se PCB najlažje oz. najhitreje širijo z gibanjem zračnih mas (Lee in Jones, 1999). Po drugi strani pa se v Planinski jami zbirajo vode iz širšega območja, ki ima tudi več industrije (Perko in Oražen Adamič, 2001).

V nekaterih primerih smo, zaradi majhne teže, morali združiti vzorce posameznih tkiv človeških ribic. S tem smo izgubili informacijo o vsebnosti PCB v posameznem tkivu. Predvidevamo lahko, da imajo osebki z višjo koncentracijo PCB v skeletnih mišicah, tudi več PCB v drugih delih telesa kot ostali osebki. Kljub majhnemu številu analiziranih človeških ribic, lahko z gotovostjo trdimo, da se PCB akumulirajo v tkivih z večjim

deležem maščob, kar je znano tudi pri drugih organizmih. Za določitev, kje točno v človeških ribicah se PCB bolj nalagajo, bi morali analizirati tkiva oz. organe posameznih osebkov ali gojiti človeške ribice v kontroliranih pogojih.

Razporejanje PCB v različna tkiva najbolje vidimo pri analiziranih človeških ribicah iz izvira Krupe. Iz povprečnih koncentracij PCB določenih v tkivih sklepamo, da se največ PCB akumulira v visceralnem maščevju in adipoznem tkivu, nato v jetrih in mišicah. Podoben trend razporejanja PCB v tkiva opazimo tudi na referenčnih lokacijah (Sliki 30 in 32). Najmanjšo povprečno koncentracijo PCB v tkivih človeških ribic iz izvira reke Krupe smo določili v ledvicah, nato v prebavni cevi. V skeletnih mišicah je vsebnost PCB verjetno višja kot v prebavni cevi, kljub temu, da povprečne vrednosti kažejo nasprotno (Slika 30). Kakorkoli že, razlika v povprečnih koncentracijah PCB med mišicami in prebavno cevjo ni velika. V mišicah treh osebkov iz izvira reke Krupe smo izmerili višje vsebnosti PCB kot v prebavni cevi (Preglednica 18).

V ledvicah, kot že omenjeno, je vsebnost PCB najmanjša (Preglednica 18 in Slika 30). Ledvica so glavni izločevalni organ vretenčarjev. Skrbijo za osmoregulacijo oz. ravnotežje soli in vode v telesu ter izločajo nerabne vodotopne metabolite (Purves in sod., 2001). Nizke koncentracije PCB v ledvicah človeških ribic so posledica izločevalne narave tega organa ter slabe vodotopnosti oz. izjemne lipofilnosti PCB.

V primerjavi z drugimi tkivi človeških ribic smo nižje koncentracije PCB izmerili tudi v prebavni cevi. Po vsej verjetnosti se PCB, zaradi svoje nepolarnosti in lipofilnosti, v prebavni cevi vežejo na oz. v maščobne kapljice ter nato skupaj z lipidi vstopajo v črevo (Walker, 2001). Glede na to, da se maščobe iz črevesja transportirajo v kri, limfo in jetra (Randall in sod., 2002), je nizka vsebnost PCB razumljiva, čeprav so pri človeških ribicah, ki se nekaj časa niso prehranjevale odkrili številne lipidne kapljice (Bulog in sod., 2000). Podatka o sestradanosti analiziranih osebkov ne poznamo.

Jetra vretenčarjev imajo mnogo funkcij. Poleg žlezne vloge delujejo tudi kot center presnove in skladiščenja rezervnih ter razstrupljanja toksičnih snovi. Pri ribah in dvoživkah so pomembno skladišče lipidov, saj le-te nimajo toliko adipoznega tkiva kot ptiči in sesalci

(Hadley, 1985). Bulog in sod. (2000) so odkrili, da je v jetrnih celicah človeških ribic veliko lipidnih vključkov. Prebavljena (s PCB kontaminirana) hrana, ki se absorbira v črevesju, potuje v presnovo v jetra (Purves in sod. 2006). Zato ni presenetljivo, da je vsebnost PCB v jetrih analiziranih osebkov tako visoka (Sliki 30 in 32).

Najvišjo vsebnost PCB smo, zaradi njihove lipofilnosti, izmerili v visceralnem maščevju in adipoznem tkivu (Slike 30 in 32). Adipozno tkivo je specializirano vezivno tkivo, sestavljeno iz maščobnih celic - adipocitov. Njegova glavna vloga je skladiščenje energijsko bogatih snovi (Ross in sod., 2003). Kot že omenjeno, je količina tega tkiva pri dvoživkah majhna. Pri repatih dvoživkah (o. Urodela) so zaloge maščob shranjene predvsem v repu (Fitzpatrick, 1976; Herzog, 2006). Višje koncentracije PCB smo pričakovali tudi zaradi morebitnega vstopanja PCB v telo skozi kožo, saj se PCB načeloma lahko zadržijo v podkožnem maščevju. V adipoznem tkivu osebk P188 je vsebnost PCB za približno 4-krat višja kot v njegovih skeletnih mišicah. Pri osebku P186 pa le za 1-krat (Preglednica 18). Visoke koncentracije PCB tako v adipoznem tkivu kot visceralnem maščevju lahko pojasnimo tudi s transportom lipidov iz jeter v periferne celice za skladiščenje (npr. v adipocite). Jetra imajo namreč ključno vlogo v presnovi lipidov in lipoproteinov (Bizjak Mali, 2002).

Mišice živali vsebujejo lipide, saj jih potrebujejo kot energijo za svoje delovanje (Purves in sod., 2001). Sheridan (1998) navaja, da dvoživke skladiščijo maščobo tudi v mišicah. Zaradi izrazite lipofilnosti in hidrofobnosti PCB, njihova določitev v skeletnih mišicah človeških ribic ni nenavadna. V primerjavi z izmerjeno koncentracijo PCB v skeletnih mišicah rib iz reke Krupe leta 2005, je vsebnost PCB v človeških ribicah višja. Pri postrvih (*Salmo trutta m. fario* L., 1758) je vsebnost v povprečju 18-krat manjša kot pri človeških ribicah. Pri ostalih ribah pa v povprečju 59-krat manjša. Med analiziranimi ribami so postrvi edine izključno karnivore, hranijo se z nevretenčarji in ribami (Povž in Sket, 1990). Tako so najvišje v prehranjevalni verigi reke Krupe, podobno kot človeške ribice v podzemlju. Zato je razlika v vsebnosti PCB, katerih značilnost je biomagnifikacija, med postrvmi in človeškimi ribicami manjša kot pa med človeškimi ribicami in ostalimi ribami. Tudi leta 1991 so bile koncentracije PCB v skeletnih mišicah rib 35-krat nižje, kot smo jih izmerili v skeletnih mišicah človeških ribic. Le pri dveh postrvih, ulovljenih na izviru

Krupe, je bila vsebnost v enakem velikostnem razredu (155 in 177 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže) (Polič, 2005a). Višja vsebnost PCB v skeletnih mišicah človeških ribic, v primerjavi z ribami, je posledica življenja človeških ribic bližje virom onesnaženja in s tem večji izpostavljenosti PCB. V podzemlju zaledja Krupe so koncentracije PCB v vodi in sedimentu zagotovo višje kot pa so na izviru reke.

Način in vsebnost akumuliranih PCB, se lahko znotraj populacije razlikuje tudi zaradi neenakomerne onesnaženosti zaledja Krupe. Kras Gorjancev in Kočevskega Roga, od koder se vode stekajo proti Krupi, je v primerjavi s podzemljem okolice tovarne Iskra v Semiču ter pod drugimi znanimi in divjimi odlagališči PCB, manj oz. ni obremenjen. Na širšem območju podzemlja tovarne in odlagališč so posamezna mesta na katerih bi lahko izmerili višjo vsebnost PCB. Tak primer so stranskih rovi, kjer so koncentracije PCB v jamski ilovici oz. sedimentih lahko zelo visoke, saj jih voda doseže le ob obilnejših padavinah. Polič (2005a) je ugotovil, da se koncentracija PCB v vodi izvira Krupe zviša po daljšem deževnem obdobju, kar je verjetno posledica izpiranja iz omenjenih rovov. Občasno zalit del Pivškega rokava Planinske jame to potrjuje. Vsebnost PCB, ki smo jo izmerili v sedimentu rokava, je sicer samo za okoli 1,5-krat višja kot na vhodu jame, vendar pa je vsebnost 4,4'-DDE za približno 32,5-krat višja kot na vhodu. V jezercih slepih rovov, ki nastanejo v sušnem obdobju, najdemo človeške ribice (Bulog, 1994). Vanje zaidejo ob visokih vodah ter po upadu nivoja podtalnice tam ostanejo različno dolgo. Na ta način so v svojem okolju izpostavljene različnim koncentracijam onesnažil, še posebej če so teritorialne. Do sedaj so teritorialnost pri človeških ribicah opazili le v času parjenja (Aljančič in sod., 1993). Osebek P189 nakazuje, da je živel pri nižjih koncentracijah PCB v svojem okolju, saj ima najnižjo vsebnost PCB v skeletnih mišicah. V povprečju je imel 2-krat nižjo od ostalih ujetih osebkov, kljub temu da ni najlažji in najmanjši. Opazili smo, da spol, velikost in teža živali, verjetno tudi starost, ne vplivajo na vsebnost PCB. Enako so opazili tudi pri pravih žabah (g. *Rana*) (Fontenot in sod., 2000) in pisanem nekturu (*Necturus maculosus*) (Bonin in sod., 1995). Način in vsebnost akumuliranih PCB v človeških ribicah je zaradi njihove dolgoživosti bolj primerljiva s pisanimi nekturi, ki živijo okoli 30 let (AmphibiaWeb ... , 2008), kot pa z relativno kratkoživimi žabami. Podobna nihanja koncentracij PCB lahko opazimo pri enako starih ribah, predvsem postrvih, iz reke Krupe, ki so jih analizirali leta 2005 (Preglednica 7). Za postrvi je

značilno, da so teritorialne ribe (Povž in Sket, 1990). Vpliv različno obremenjenega habitata na vsebnost PCB v skeletnih mišicah pri skoraj enako težkih in velikih sameih človeških ribic (P159 in P161) iz Otovskega brega, nam dodatno potrjuje tudi vsebnost 4,4'-DDE. Vsebnost 4,4'-DDE je v samcu P161 za več kot 6-krat večja kot v samcu P159, čeprav je slednji za malenkost večji oz. težji. Tudi vsebnost PCB pri obeh omenjenih sameih se razlikuje. Pri P161 je 2,5-krat večja kot pri P159. Bonin in sod. (1995) poročajo o nihanju vsebnosti PCB tudi pri enako velikih samicah pisanih nekturov iz istega vzorčevalnega mesta, kar si razlagajo kot razliko med osebki v gibanju znotraj habitata in različno izrabo hrane v njem. Koliko dejansko človeške ribice migrirajo po območju, ki ga poseljujejo, nam ni znano. V izviru Krupe se tako lahko pojavljajo le osebki iz bližnje okolice. Drugi možen razlog za nižjo koncentracijo PCB v mišicah P189 je njegov metabolizem. Vsak organizem ali osebek ima samo njemu lastno intenziteto oz. stopnjo metabolizma, ki je zapisana v genomu. Tako imajo osebki različno sposobnost izločanja toksičnih snovi iz telesa. Za potrditev vpliva migracij ali individualnega metabolizma na vsebnost PCB, bi potrebovali več osebkov iz izvira Krupe ali izvedbo kontroliranega poskusa gojenja človeških ribic v s PCB onesnaženi vodi in sedimentu pod enakimi pogoji, kar pa v primeru strogo zakonsko varovane vrste, kot je človeška ribica, ne pride v poštev.

Vzorec razporejanja posameznih PCB kongenersov je pri vseh proučevanih človeških ribicah podoben, ne glede na spol, velikost in težo živali. V tkivih prevladujejo višje klorirani kongeneri. V našem primeru so to analizirani PCB 118, 138, in 153. Zanje je značilno, da slabo hlapijo in se v sedimentu močneje vežejo. Težje se metabolizirajo ter se po prehranjevalni verigi ohranjajo oz. biomagnificirajo (Walker, 2001). PCB 180 je heptaklorobifenil ter v naši raziskavi kongeners z največjim številom klorovih atomov. Kljub temu ga je v tkivih človeških ribic iz izvira Krupe najmanj. Tudi pri ribah in zoobentosu iz Krupe, analiziranih leta 2005, je vsebnost PCB 180 med najnižjimi (Posledice ... , 2005: 20). Najverjetnejši razlog za njegovo nizko vsebnost je ta, da je delež omenjenega kongenersa v tehničnih mešanicah, ki so jih uporabljali v tovarni v Semiču, zelo nizek. To potrjuje tudi vsebnost PCB 180 v sedimentih Krupe, vzorčevalnega mesta 'potok' in jame Lebice. V tkivih človeških ribic iz Otovskega brega, še bolj pa iz Planinske jame, se vsebnost PCB 180 poveča. Vendar še vedno ne doseže koncentracij PCB 138 in 153. Nizko vsebnost PCB 180, tako v analiziranih sedimentih kot v tkivih človeških ribic,

zato lahko pripišemo manjši prisotnosti tega kongenersa v okolju. V zelenih žabah (*Rana clamitans*) (Ryan Loveridge in sod., 2007), v kačah vodaricah (*Nerodia* sp.) in jajcih pisanih nekturov ter srebrnih galebov (*Larus argentatus*) (Bishop in Rouse, 2000) iz Severne Amerike so vsebnosti PCB 138, 153 in 180 podobne. Maervoet in sod. (2004) so pri piščancih, ki so bili izpostavljeni PCB, dokazali podobno bioakumulacijo omenjenih kongenersov v mišicah.

Najnižjo vsebnost v tkivih osebkov imata v povprečju PCB 28 in 31. Za nižje klorirane PCB kongenerse je namreč značilno, da so v okolju bolj hlapni. Tudi metabolizirajo se hitreje, saj imajo v molekuli več prostih mest, na katerih lahko pride do hidroksilacije. Mesto vezave encimov iz skupine citokrom P450 najlažje poteka na obročih, kjer sta sosednji mesti *orto* in *meta* ali pa *meta* in *para* nesubstituirani (Walker, 2001). PCB 28 in 31 po kemijski strukturi ustrezata danemu kriteriju. Tudi pri analiziranih ribah iz Krupe je vsebnost PCB 28 med najnižjimi (Preglednica 7). Različne oblike encima citokrom P450 so dokazali tudi pri pisanih nekturih (Oleksiak in sod., 2000). Ker so nekturi najbližji sorodniki človeške ribice, lahko omenjene encime pričakujemo tudi pri človeških ribicah. Koncentracije nižje kloriranih PCB po prehranjevalni verigi padajo (Walker, 2001). V sedimentih iz območja Krupe, Otovskega brega in Planinske jame je delež PCB 28, 31 in 52 med vsemi analiziranimi kongenseri višji, kot je v tkivih človeških ribic (Slika 34 in 37).

V tkivih človeških ribic ulovljenih v izviru Krupe smo, v primerjavi z osebki iz drugih lokalitet, določili največ PCB 101. Zanimivo je, da je največ PCB 101 le v eni postrvi iz reke Krupe analizirani leta 2005 (Preglednica 7). Razlika je verjetno posledica dolgoživosti človeške ribice. Razlog za večjo vsebnost PCB 101 v tkivih človeških ribic, bi lahko pripisali velikemu deležu PCB 101 v tehničnih mešanicah uporabljenih v tovarni v Semiču. Tudi v večini vzorcev sedimentov iz reke Krupe je največ PCB 101. Monosson in sod. (2003) navajajo, da je sestava PCB kongenersov v tkivih organizmov podobna sestavi v okolju. Slabša zmožnost človeških ribic, da metabolizirajo omenjeni kongeners je manj verjetna. Osebki iz Planinske jame imajo višjo vsebnost PCB 52, ki je tetraklorobifenil. PCB 52, ima v primerjavi s PCB 101, ki je pentaklorobifenil, dve potencialni mesti za vezavo encima citokrom P450 in je tudi bolj vodotopen. Za določitev razporeditve

posameznih PCB kongenersov v različna tkiva človeških ribic in metabolizma kongenersov bi morali v analiziranih tkivih določiti še nekaj dodatnih PCB kongenersov, npr. *neorto*, *mono-orto* substituirane PCB. S temi podatki bi lahko z večjo gotovostjo odgovorili na vprašanje, v kolikšni meri so človeške ribice sposobne regulirati oz. izločati PCB. Dobljeni rezultati sicer nakazujejo, da delna regulacija le obstaja (nizke vsebnosti nižje kloriranih PCB v tkivih). Vsebnost PCB v človeških ribicah iz izvira Krupe v primerjavi z ribami niti ni tako velika. Če primerjamo najvišjo izmerjeno vsebnost PCB v skeletnih mišicah 3 leta stare postrvi iz izvira Krupe s skeletnimi mišicami človeške ribice P188, ki je stara vsaj 14 let, je vsebnost PCB v slednji višja le za dobrih 9,5-krat (Preglednica 7).

Izmerjene koncentracije PCB v tkivih človeških ribic, predvsem iz izvira Krupe, so tako visoke, da pri živalih že povzročajo toksične učinke. Johnson in sod. (1999) so odkrili poškodbe organov pri tigrastih aksolotlih (*Ambystoma tigrinum*) pri vsebnosti PCB v telesu 0,55 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže. Pri paglavcih sekulje (*Rana temporaria*) in afriške krempljičarke (*Xenopus laevis*), ki so uživali hrano kontaminirano s PCB (vsebnost Clophena A50 v hrani je bila 2 $\mu\text{g g}^{-1}$), se je podaljšal čas razvoja do metamorfoze in povečala smrtnost osebkov (40 % pri afriški krempljičarki in 33 % pri sekulji). Pri več kot polovici paglavcev so se pojavile deformacije repa in oči (Gutleb in sod., 2000). Pri našem delu nismo opazili vidnih morfoloških sprememb telesa oz. organov. Osebki iz izvira Krupe so bili temneje pigmentirani, kot osebki iz drugih lokalitet. Temnejša koža, zaradi kopičenja določenih pigmentov, bi lahko bila posledica izpostavljenosti PCB. Znana je namreč povečana pigmentacija kože pri ljudeh, ki so se zastrupili s PCB (Wong, 1981). Pomembno je poudariti, da je temnejša koža lahko posledica povsem naravnih vzrokov. Zaradi morebitnega časovno in prostorsko ločenega vseljevanja populacij prednikov človeških ribic v podzemlje, se je morebiti ohranila barva kože bližja izvorni (Gorički, 2006). Temnejša koža bi bila lahko tudi posledica pojavljanja človeških ribic v izvira Krupe v dnevnem času. To ni povsem nemogoče, saj je lega izvira senčna, v njem pa se gosto razraščajo nitaste alge in druge vodne rastline. Tako je temna koža človeških ribic posledica izpostavljenosti majhni jakosti dnevne svetlobe. Vendar pa so človeške ribice podnevi bolj ranljive, saj v izvornem delu Krupe živijo tudi postrvi, ki jih lahko napadajo.

Pojavljanje človeških ribic podnevi v izviru Krupe bi morali potrditi z rednim opazovanjem.

Vsebnost PCB v sedimentih vseh vzorčevalnih mest je po pričakovanjih nižja kot v analiziranih tkivih človeški ribic. Na izviru Krupe smo najvišje koncentracije PCB izmerili na vzorčevalnih mestih '*levi breg*' in '*desni breg*'. Obe vzorčevalni mesti sta nekaj metrov oddaljeni od skalne stene. Gre za strm ilovnati breg reke na samem izviru (Slika 13). V primerjavi s sedimenti iz dna izvira in plitvin nižje od izvira je vsebnost PCB opazno višja. Strm ilovnat breg je bolj kompakten, zato je premeščanje sedimentov in v njih adsorbiranih PCB manjše, kot na ostalih vzorčevalnih mestih. Vidnejše razlike med vzorčevalnim mestom '*plitvina II*', ki je okoli 300 m nižje od izvira, in ostalimi vzorčevalnimi mesti, razen omenjenega ilovnatega brega, ni. Izmerjene koncentracije PCB so primerljive s koncentracijami pred letom 1992. Le dve meritvi iz poznejših let sta podobno visoki. Vsebnost PCB je oktobra 1995 znašala 7,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ in avgusta 1999 5,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Polič, 2005a). V primerjavi s koncentracijami PCB v sedimentu izmerjenih leta 2005 (Polič, 2005b), je naša najnižja izmerjena koncentracija višja za 11-krat, najvišja izmerjena koncentracija v sedimentu pa je višja kar za 125-krat. Polič (2005a) ugotavlja, da vsebnosti PCB v sedimentu Krupe zelo nihajo in so odvisne od načina odvzema vzorca, mikrolokacije, hidroloških razmer, profila struge itd. Zaraščenost z vodnimi in obvodnimi rastlinami tudi vpliva na vsebnost PCB v sedimentih. Znano je, da rastline privzemajo PCB s koreninami (Mahanty, 1986). Koncentracija PCB v sedimentih Krupe nam kaže, da je obremenjenost reke in njenega zaledja še vedno velika. Tako kot obstajajo točke oz. mikrolokacije s povišano vsebnostjo PCB v sedimentih reke, zagotovo obstajajo tudi v podzemlju širšega območja reke Krupe, kar je že bilo omenjeno.

Sediment vzorčevalnega mesta '*potok*', ki je od izvira Krupe oddaljeno okoli 1,7 km, ima v primerjavi s sedimenti izvirnega dela Krupe, mnogo nižjo vsebnost PCB. Voda s sedimenti, ki priteče v ta izvir, prihaja iz s PCB manj obremenjenega območja. Prav tako ne moremo zanemariti vpliva odvzema sedimentov. Vzorec je bil odvzet v sredini struge pod skalno steno (Slika 14), kjer ob povišanih pretokih po obilnejših padavinah, prihaja do močnega premeščanja sedimentov, ki jih nato odplavlja v Krupo.

Mesto odvzema sedimentov v jami Lebici pri Semiču je skalna polica ob vhodu v jamo (Slika 16). Nizka izmerjena vsebnost PCB je verjetno posledica tega. Ker gre za vodno jamo, ki je blizu sami tovarni v Semiču, bi pričakovali povišano vsebnost PCB v sedimentu, kljub navajanju Habiča in Kogovška (1992), da gre le za lokalno ujeto vodo, ki ni neposredno v zvezi s podtalnico v zaledju Krupe, čeprav dopuščata možno povezavo.

Nizki vsebnosti PCB in 4,4'-DDE v sedimentih Otovskega brega sta lahko dokaz o vedno manjši obremenjenosti okoliškega podzemlja, lahko pa sta le posledica majhne količine sedimentov v strugi potoka. Tudi tukaj se sedimenti ob povišanih pretokih vode premeščajo oz. jih odplavlja naprej v podzemlje.

Premeščanje sedimentov je odgovor tudi za razliko v vsebnosti PCB in 4,4'-DDE med vhomom in Pivškim rokavom Planinske jame. Na vhomu jame je koncentracija obeh onesnažil manjša, saj so bili sedimenti odvzeti v glavnem toku reke Unice. V Pivškem rokavu pa so bili odvzeti v jezeru, v katerega priteka oz. odteka voda le občasno. Količina PCB in 4,4'-DDE v sedimentih iz Planinske jame je večja, kot v sedimentih Otovskega brega, kar je posledica večjega prispevnega območja Planinske jame.

Ni presenetljivo, da smo povišane vsebnosti 4,4'-DDE odkrili v človeških ribicah iz Otovskega brega in Planinske jame. Otovski breg se nahaja pod vinogradi in ostalimi kmetijskimi površinami. Tudi vsebnost PCB je lahko posledica kmetijske dejavnosti, saj so bili del insekticidov (Webber, 2006). Sklepamo, da bi 4,4'-DDE lahko dokazali tudi v človeških ribicah iz izvira Krupe, saj je raba tal v zaledju Krupe še bolj kmetijsko intenzivna. Vsebnost 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic iz Planinske jame je višja v primerjavi s tkivi osebkov iz Otovskega brega. Razlog je verjetno v že omenjenem večjem prispevnem območju Planinske jame. Podobno kot pri PCB je vsebnost 4,4'-DDE višja v adipoznem tkivu kakor v jetrih in skeletnih mišicah (Sliki 32 in 33). Razlogi za razliko v koncentracijah med posameznimi tkivi so najverjetneje podobni kot za PCB, predvsem akumuliranje obeh spojin v tkivih z večjim deležem maščob, saj sta obe izrazito lipofilni (Walker, 2006). Tudi za razlike v količini 4,4'-DDE med posameznimi osebki bi lahko navedli podobne razloge kot za PCB. To sta različna sposobnost osebkov metaboliziranja ksenobiotikov oz. življenje osebkov pri različnih koncentracijah okoljskih onesnažil.

Seveda je število analiziranih osebkov oz. tkiv premajhno za dokončne zaključke glede akumulacije DDE v posamezna tkiva. Zanimivo je, da so vsebnosti 4,4'-DDE in PCB v tkivih človeških ribic, ulovljenih na isti lokaliteti, podobno visoke. Eden od razlogov bi lahko bil, da je množina obeh onesnažil v okolju podobna.

Na splošno velja, da mora biti izbrana indikatorska vrsta široko razširjena, relativno pogosta in lahko dostopna. Osebkni morajo biti dovolj veliki za analizo tkiv, dolgoživeči in neproblematični za določanje starosti. Izbrana indikatorska vrsta mora akumulirati okoljska onesnažila nad mejo detekcije, brez letalnih učinkov. Opazna mora biti povezava med vsebnostjo onesnažil v tkivih in povprečno koncentracijo v okolju. Ta povezava mora biti primerljiva med osebki, med vzorčevalnimi mesti in v vseh pogojih (Bonin, 1995). Človeška ribica ustreza večini omenjenih kriterijev za izbor kot indikatorska vrsta. Za podzemlje dinarskega krasa je verjetno edini primeren bioindikator za ugotavljanje onesnaženja. Zaradi svoje dolgoživosti je še posebej primerna za opazovanje kopičenja okoljskih onesnažil v daljšem časovnem obdobju (npr. PCB in pesticidi). To seveda ne pomeni, da bi jo v bodoče na veliko izrabljali v ta namen, saj ne poznamo velikosti in hitrosti obnavljanja populacije. Upoštevati moramo tudi strogo zakonsko zaščito človeške ribice. Glede na počasen in dolgotrajen telesni razvoj, veliko občutljivost dvoživk na okoljska onesnažila ter omejenosti virov hrane v jamskih ekosistemih, se lahko številčnost človeških ribic zaradi hudega onesnaženja, kot je primer območja reke Krupe, hitro zmanjša. Zato je smiselnost uporabe človeških ribic za tovrstne analize le v primeru preverjenega onesnaženja v nebioloških vzorcih ter kot dopolnilna metoda za potrditev onesnaženosti okolja.

5.2 SKLEPI

V diplomskem delu smo določali vsebnost PCB v človeških ribicah in sedimentih iz okolice reke Krupe. Poleg PCB smo v človeških ribicah in sedimentih iz Otovskega brega in Planinske jame določali tudi 4,4'-DDE. V naslednjih točkah so povzete glavne ugotovitve:

- Vsebnost PCB v tkivih človeških ribic iz izvira Krupe je mnogo višja v primerjavi z osebki izbranih referenčnih lokalitet (Otovskega brega in Planinske jame). Enako velja za sedimente.
- V ledvicah človeških ribic je vsebnost PCB najmanjša. Nizke koncentracije PCB v ledvicah so posledica izločevalne narave tega organa, slabe vodotopnosti oz. izjemne lipofilnosti PCB. Relativno malo PCB, v primerjavi z ostalimi tkivi, smo izmerili tudi v prebavni cevi. Najvišje vsebnosti PCB smo izmerili v visceralnem maščevju, adipoznem tkivu in jetrih človeških ribic. V adipoznem tkivu osebka P188 iz izvira Krupe je vsebnost PCB za približno 4-krat višja kot v njegovih skeletnih mišicah. Pri osebku P186 iz izvira Krupe pa le za 1-krat.
- V primerjavi z izmerjeno koncentracijo PCB v skeletnih mišicah rib iz reke Krupe v prejšnjih letih je vsebnost PCB v človeških ribicah iz izvira Krupe višja. Kljub temu, da neposredna primerjava človeških ribic z ribami, zaradi različnih bioloških značilnosti obeh vrst ni najbolj primerna, lahko sklepamo, da je večja vsebnost PCB v človeških ribicah posledica življenja bližje virom onesnaženja in njihove dolgoživosti.
- Na vsebnost PCB in razporejanje posameznih kongenersov spol, velikost in teža osebkov ne vplivajo. Način akumuliranja PCB se lahko znotraj populacije razlikuje tudi zaradi neenakomerne onesnaženosti okolja v katerem posamezni osebki živijo.
- V tkivih prevladujejo višje klorirani kongenersi (PCB 118, 138, in 153). Nizko vsebnost PCB 180 v analiziranih tkivih človeških ribic in sedimentih lahko pripišemo manjši prisotnosti tega kongenersa v okolju. Sklepamo, da delna regulacija PCB v človeških ribicah obstaja.
- Mogoče je, da visoke koncentracije PCB izmerjene v tkivih človeških ribic že povzročajo toksične učinke. Temnejša koža osebkov iz izvira Krupe bi lahko bila posledica izpostavljenosti PCB.

- Vsebnost PCB v sedimentih vseh vzorčevalnih mest je po pričakovanjih nižja kot v tkivih človeških ribic. Izmerjene koncentracije PCB v sedimentih Krupe so primerljive s koncentracijami pred letom 1992. Koncentracije PCB v sedimentih govorijo o še vedno veliki obremenjenosti reke in njenega zaledja.
- Koncentracija PCB, predvsem pa 4,4'-DDE v sedimentih iz Planinske jame je višja, kot v sedimentih Otovskega brega. Podobno velja za človeške ribice s te lokalitete. Razlog temu je večje prispevno območje Planinske jame. Vsebnost 4,4'-DDE v človeških ribicah iz Otovskega brega in Planinske jame je posledica uporabe insekticida DDT v kmetijstvu. Sklepamo, da bi 4,4'-DDE lahko dokazali tudi v človeških ribicah iz izvira Krupe, saj je raba tal v zaledju Krupe kmetijsko intenzivna. Podobno kot pri PCB je vsebnost 4,4'-DDE višja v adipoznem tkivu kot pa v jetrih in skeletnih mišicah. Razlogi za razliko v koncentracijah med posameznimi tkivi in osebki so verjetno podobni kot za PCB, saj imajo podobne lastnosti.
- Človeška ribica je pogojno primerna bioindikatorska vrsta za ugotavljanje dolgotrajnega onesnaženja dinarskega krasa.

6 POVZETEK

Človeška ribica (*Proteus anguinus* Laurenti, 1768) je neotenična, repata dvoživka. V Evropi je edini poznani jamski vretenčar in je endemit dinarskega krasa. Dolgoživost človeške ribice, okoli 70 let, pomeni njeno daljšo izpostavljenost morebitnim toksičnim snovem v okolju, npr. pesticidom, težkim kovinam.

Poliklorirani bifenili ali PCB so sintetični ciklični ogljikovodiki z vezanimi klorovimi atomi na fenilne obroče, ki so se veliko uporabljali predvsem v elektro industriji. Zaradi njihove široke uporabe so ušli tudi v okolje. Ker so kemijsko in termično stabilni, z nizko topnostjo v vodi ter izrazito lipofilnostjo, so v okolju dolgo obstojni. V organizmih se bioakumulirajo in po prehranjevalnih verigah biomagnificirajo. Glavna pot vnosa PCB za kopenske organizme je hrana, za vodne pa, poleg kontaminirane hrane, še dihala (škrge) in koža. V splošnem se PCB slabo presnavljajo in se zato zelo počasi izločajo iz telesa. Toksične učinke PCB so dokazali skoraj pri vseh vretenčarjih.

V kraškem zaledju reke Krupe, katere izvir je znano najdišče človeške ribice, je prišlo v preteklosti do močnega onesnaženja podzemlja s PCB. Tovarna kondenzatorjev v Semiču je v obdobju od leta 1962 do 1983, ko so odkrili visoko vsebnost PCB v vodi Krupe, proizvodne odpadke kontaminirane s PCB, odlagala v širši okolici tovarne (skupaj okoli 70 t). Podzemne vode zaledja Krupe so se tako onesnažile s spiranjem in izcejanjem PCB iz onesnaženega površja. V letih od 1983 do 1992 so bile koncentracije PCB v vodi od 0,1 do 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, v sedimentih pa med 10 in 800 $\mu\text{g g}^{-1}$

V diplomskem delu smo določali vsebnost PCB v tkivih človeških ribic in sedimentih širšega območja reke Krupe. Za primerjavo smo izmerili tudi koncentracijo PCB v tkivih človeških ribic in sedimentih še iz Otovskega brega pod vasjo Otovec pri Črnomlju in Planinske jame, v katerih smo pričakovano dobili nižje vsebnosti PCB, kot v vzorcih z območja Krupe.

Vzorce tkiv človeških ribic in sedimentov smo ekstrahirali s Soxhletovim aparatom ter jih po čiščenju analizirali z GC-ECD plinskim kromatografom. V vzorcih smo, s pomočjo

eksternega standarda za PCB, določali vsebnost sedmih indikatorskih PCB ter njihovo vsoto. Potrditev identitete PCB smo naredili še z meritvijo vzorcev in eksternega standarda z GC-MSD plinskim kromatografom. Pri analizi človeških ribic iz Otovskega brega in Planinske jame smo odkrili izstopajoči kromatogramski vrh, ki smo ga z metodo standardnega dodatka določili kot 4,4'-DDE. DDE (dikloro-difenil-dikloroetilen) nastane z dehidroklorinacijo DDT (dikloro-difenil-trikloroetan), ki se je v preteklosti uporabljal kot insekticid.

Vsebnost PCB v tkivih človeških ribic iz izvira Krupe je med $145 \mu\text{g g}^{-1}$ in $1291 \mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže. V primerjavi z osebkami iz Otovskega brega in Planinske jame je mnogo višja (v povprečju 155-krat višja oz. 74-krat višja). V ledvicah človeških ribic je povprečna vsebnost PCB najnižja. Nižje koncentracije PCB v ledvicah so posledica izločevalne narave tega organa, majhne vodotopnosti oz. izjemne lipofilnosti PCB. V primerjavi z drugimi tkivi smo nižjo povprečno vsebnost PCB izmerili tudi v prebavni cevi. Izmerjene visoke povprečne koncentracije PCB v jetrih osebkov lahko pojasnimo z vlogo jeter, kot centra presnove in skladiščenja lipidov pri dvoživkah. Najvišjo vsebnost PCB smo po pričakovanjih izmerili v visceralnem maščevju in adipoznem tkivu, saj so PCB izrazito lipofilni. Pri dveh osebkah iz izvira Krupe so bile koncentracije PCB v adipoznem tkivu višje (za 4-krat oz. 1-krat) kot v njunih skeletnih mišicah. V primerjavi z izmerjeno koncentracijo PCB v skeletnih mišicah rib iz reke Krupe leta 2005 je vsebnost PCB v človeških ribicah iz izvira Krupe višja. Višja vsebnost PCB v skeletnih mišicah človeških ribic v primerjavi z ribami, je posledica življenja človeških ribic bližje virom onesnaženja oz. večje izpostavljenosti PCB ter dolgoživost človeških ribic.

Vzorec razporejanja posameznih PCB kongenersov je pri vseh proučevanih človeških ribicah podoben, ne glede na spol, velikost in težo živali. V tkivih prevladujejo višje klorirani kongenersi, za katere je značilno, da se težje metabolizirajo in biomagnificirajo.

Izmerjene koncentracije PCB v sedimentih izvirnega dela Krupe so med 4 in $48 \mu\text{g g}^{-1}$ in so primerljive s koncentracijami pred letom 1992. V primerjavi s koncentracijami PCB v sedimentu izmerjenih leta 2005, je naša največja izmerjena koncentracija višja kar za 125-krat. Vzrok temu je lahko način in mikrolokacija odvzema vzorca, kar so nam potrdili

vzorci sedimenta iz jame Lebice pri Semiču, kjer smo zaradi bližine tovarne pričakovali višjo vsebnost PCB, kot pa smo jo izmerili

Vsebnost PCB in 4,4'-DDE v tkivih človeških ribic in sedimentih iz Planinske jame je višja, kot v sedimentih Otovskega brega, kar je posledica večjega prispevnega območja Planinske jame.

Na osnovi rezultatov o vsebnosti PCB v človeških ribicah in sedimentih sklepamo, da je obremenjenost reke Krupe in njenega podzemlja ter izpostavljenost človeških ribic PCB, še vedno velika.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

Aljančič M., Bulog B., Kranjc A., Josipovič D., Sket B., Skoberne P. 1993. Proteus, skrivnostni vladar kraške teme. Ljubljana, Vitrum d.o.o.: 75 str.

Antoniadou V., Konstantinou I.K., Goutner V., Sakellarides T.M., Albanis T.A., Bintoudi E. 2007. PCB Levels and Accumulation Patterns in Waterbird Eggs and in Their Prey at Lake Kerkini, a North-Eastern Mediterranean Wetland of International Importance. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 53, 2: 249–260

Atlas E., Bidleman T., Giam C.S. 1986. Atmospheric Transport of PCB to the Oceans. V: PCBs and the Environment. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 79-100

Baird C. 2003. Environmental chemistry. 2nd edition. New York, W.H. Freeman and company: 557 str.

Ballschmiter K., Rappe C., Buser H.R. 1989. Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs. V: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalens, dibenzodioxins and related products. Topics in environmental health, Vol. 4. Kimbrough R.D., Jensen A.A. (eds.). Amsterdam, Elsevier Publishers B. V.: 47-69

Bamford H. A., Chi Ko F., Baker J.E. 2002. Seasonal and Annual Air-Water Exchange of Polychlorinated Biphenyls across Baltimore Harbor and the Northern Chesapeake Bay. *Environmental Science & Technology*, 36, 20: 4245-4252

Batu V. 2005. Applied Flow and Solute Transport Modeling in Aquifers: Fundamental Principles and Analytical and Numerical Methods. Boca Raton, CRC Press: 696 str.

- Bishop C.A., Rouse J.D. 2000. Chlorinated Hydrocarbon Concentration in Plasma of the Lake Erie Water Snake (*Nerodia sipedon insularum*) and Northern Water Snake (*Nerodia sipedon sipedon*) from the Great Lakes Basin in 1998. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 4: 500-505
- Bizjak Mali L. 2002. Vpliv stradanja na ultrastrukturo hepatocitov močerila (*Proteus anguinus*, Amphibia, Urodela). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 116 str.
- Bonin J., DesGranges J.L., Bishop C.A., Rodrigue J., Gendron A., Elliott J.E. 1995. Comparative Study of Contaminants in the Mudpuppy (Amphibia) and the Common Snapping Turtle (*Reptilia*), St. Lawrence River, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 2: 184-194
- Breivik K., Sweetman A., Pacyna J.M., Jones K.C. 2001. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – a mass balance approach. 1 Global production and consumption. *The Science of the Total Environment*, 290, 1-3: 181-198
- Bulog B. 1994. Dve desetletji funkcionalno-morfoloških raziskav pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). *Acta Carsologica*, 23, 19: 247-263
- Bulog B., Bizjak Mali L., Kos M., Mihajl K., Prelovšek P.-M., Aljančič G. 2000. Biology and functional morphology of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Acta Biologica Slovenica*, 43, 3: 85-102
- Bulog B., Schlegel P., Kos M., Röhlich P., Briegleb W. 2002a. Non-visual orientation and lightsensitivity in the blind cave salamander, *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). V: Abstracts of the 16th international symposium of biospeleology. Verona, 8-15 sep. 2002. Latella L., Mezzanotte E., Tarocco M. (ur.). *Société Internationale de Biospéologie*: 31-32

- Bulog B., Schlegel P. in sod. 2002a. Non-visual orientation and light-sensitivity in the blind cave salamander, *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). V:; 2002 Sep 8-15; Verona: Società Internationale de Biosp ologie, str. 31-32.
- Bulog B., Mihajl K., Jeran Z., Toman M.J. 2002b. Trace element concentration in the tissues of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata) and the surrounding environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 136, 1-4: 147-163
- Cairns T., Doose G.M., Froberg J.E., Jacobson R.A., Siegmund E.G. 1986. Analytical Chemistry of PCBs. V: PCBs and the Environment. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 1-45
- Cenci -Kodba Z. 1998. Dolo evanje PCB v sedimentu Krupe in vrednotenje toski nih ekvivalentnih faktorje. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 74 str.
- Chiarenzelli J.R., Serudato R.J., Wunderlich M.L., Oenga G.N., Lashko O.P. 1997. PCB Volatile Loss and the Moisture Content of Sediment during Drying. *Chemosphere*, 34, 11: 2429-2436
- Chou S.F.J., Griffin R.A. 1986. Solubility and Soil Mobility of Polychlorinated Biphenyls. V: PCBs and the Environment. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 101-120
- Chuiko G.M., Tillitt D.E., Zajicek J.L., Flerov B.A., Stepanova V.M., Zhelnin Y.Y., Podgornaya V.A. 2007. Chemical contamination of the Rybinsk Reservoir, northwest Russia: Relationship between liver polychlorinated biphenyls (PCB) content and health indicators in bream (*Abramis brama*). *Chemosphere*, 67, 3: 527-536
- Cousins I.T., Jones K.C. Air-soil exchange of semi-volatile organic compounds (SOCs) in the UK. *Environmental Pollution*, 102, 1: 105-118

- de Solla S.R., Bishop C.A., Pettit K.E., Elliott J.E. 2002. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in eggs of red-legged frogs (*Rana aurora*) and northwestern salamanders (*Ambystoma gracile*) in an agricultural landscape. *Chemosphere*, 46, 7: 1027-1032
- Duda Gilliland C., Summer C.L., Gilliland M.G., Kannan K., Villeneuve D. L., Kemler Coady K., Muzzall P., Mehne C., Giesy J. P. 2001. Organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls, and metals in water, sediment, and green frogs from southwestern Michigan. *Chemosphere*, 44, 3: 327-339
- Eduljee G.H. 2001. Budget and source inventories: Issues and Challenges. V: Persistent organic pollutants. Environmental behaviour and pathways of human exposure. Harrad S. (ed.). Norwell, Kluwer Academic Publishers: 1-28
- Eisler R. 1986. Polychlorinated biphenyl hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85(1.7)
- Fitzpatrick L.C. 1976. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. *American Zoologist*, 16: 725-732
- Fontenot L.W., Noblet G.P., Akins J.M., Stephens M.D., Cobb G.P. 2000. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in ranid frogs and northern water snakes from a hazardous waste site and a contaminated watershed. *Chemosphere*, 40, 8: 803-809
- Furukawa K. 1986. Modification of PCBs by Bacteria and Other Microorganism. V: PCBs and the Environment. Volume II. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 89-100
- Gams I. 2003. Kras v Sloveniji v prostoru in času. Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 516 str.

- Gendron A.D., Bishop C.A., Fortin R., Hontela A. 1997. In vivo testing of the functional integrity of the corticosterone-producing axis in mudpuppy (Amphibia) exposed to chlorinated hydrocarbons in the wild. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 8: 1694-1706
- Girvin D.C., Slarew D.S., Scot A.J., Zipperer J.P. 1997. Polychlorinated biphenyls desorption from low organic carbon soils: measurement of rates in soil-water suspensions. *Chemosphere*, 35, 9: 1987-2005
- Gobas F.A.P.C., Morrison H.A. 2000. Bioconcentration and Biomagnification in the Aquatic Environment. V: *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences*. Boethling R.S., Mackay D. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 189-232
- Gorički Š. 2006. Filogeografska in morfološka analiza populacij močerila (*Proteus anguinus*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 76 str.
- Gutleb A.C., Appelman J., Bronkhorst M.C., van den Berg J.H.J., Spenkelink A., Brouwer A., Murk A.J. 1999. Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8, 1: 1-14
- Gutleb A.C., Appelman J., Bronkhorst M., van den Berg J.H.J., Murk A.J. 2000. Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *The Science of the Total Environment*, 262, 1: 147-157
- Habič P., Kogovšek J. 1992. Sledenje voda v kraškem zaledju Krupe v JV Sloveniji. *Acta carsologica*, 21: 35-76

Hadley N. F. 1985. *The Adaptive Role of Lipids in Biological System*. New York, John Wiley & Sons.

Haugen J.H., Wania F., Lei Y.D. 1999. Polychlorinated Biphenyls in the Atmosphere of Southern Norway. *Environmental Science and Technology*, 33, 14: 2340-2345

Herzog T. 2004. Razporeditev adipoznega tkiva in biokemijska analize tkiv močerilarjev (Amphibia: Proteidae). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 69 str.

Hoogenboom L.A.P. 2004. Dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs). V: *Pesticide, veterinary and other residues in food*. Watson D.H. (ed.). Cambridge, Woodhead publishing Limited: 519-535

Ivanovič M., Plut D., Polič S. 1997. *Naravni spomenik reka Krupa. Zloženska*. Turistično društvo Semič.

Jensen S. 1974. The PCB story. *Ambio*, 1, 4: 123-131

Jofré M.B., Karasov W.H. 2008. Effect of mono-ortho and di-ortho substituted polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on leopard frog survival and sexual development. *Chemosphere*, 70, 9: 1609-1619

Johnson M.S., Franke L.S., Lee R.B., Holladay S.D. 1999. Bioaccumulation of 2,4,6-Trinitrotoulene (TNT) and PCBs Trough Two Routes of Exposure in a Terrestrial Amphibian: Is the Dermal Route Significant?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 5: 873-878

Kadokami K., Takeishi M., Kuramoto M., Ono Y. 2004. Maternal transfer of organochlorine pesticides, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs to their eggs. *Chemosphere*, 57, 5: 383-389

- Katbamna B., Jelaso Langerveld A., Ide C.F. 2006. Aroclor 1254 impairs the hearing ability of *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 192, 9: 971-983
- Kos M., Bulog B., Szél Á., Röhlich P. 2001. Immunocytochemical demonstration of visual pigments in the degenerate retinal and pineal photoreceptors of the blind cave salamander (*Proteus anguinus*). *Cell and Tissue Research*, 303, 1: 15-25
- Kroll J. E. 1985. Estimation of the limit of detection in chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 23, 9: 422-425
- Lee R.G.M., Jones K.C. 1999. The Influence of Meteorology and Air Masses on Daily Atmospheric PCB and PAH Concentrations at a UK Location. *Environmental Science & Technology*, 33, 5: 705-712
- Lovrenčič V. 2001. Tehnična pojasnila k Pravilniku o odstranjevanju polikloriranih bifenilov (PCB) in polikloriranih terfenilov (PCT). Ur.l. RS, št. 15/00. Ljubljana: Ministrstvo za okolje in prostor, Uprava Republike Slovenije za varstvo narave: 57 str.
- Maervoet J., Chu S.G., De Vos S., Covaci A., Voorspoels S., De Schrijver R., Schepens P. 2004. Accumulation and tissue distribution of selected polychlorinated biphenyl congeners in chickens. *Chemosphere*, 57, 1: 61-66
- Magnusson K., Ekelund R., Grabic R., Bergqvist P.-A. Bioaccumulation of PCB congeners in marine benthic infauna. *Marine Environmental Research*, 61, 4: 379-395
- Mahanty H. K. 1986. Polychlorinated Biphenyls: Accumulation and Effects Upon Plants. V: PCBs and the Environment. Volume II. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 1-47
- Meijer S.N., Ockenden A., Sweetman A., Breivik K., Grimalt J.O., Jones K.C. 2003. Global Distribution and Budget of PCBs and HCB in Background Surface Soils:

Implications for Sources and Environmental Processes. *Environmental Science & Technology*, 37, 4: 667-672

Monosson E., Ashley J.T.F., McElroy A.E., Woltering D., Elskus A.A. 2003. PCB congener distributions in muscle, liver and gonad of *Fundulus heteroclitus* from the lower Hudson River Estuary and Newark Bay. *Chemosphere* 52, 4: 777-787

Oleksiak M. F., Hahn M. E., Stegeman J. J. Diversity of cytochrome P450 2 family genes in non-mammalian vertebrates. *Marine Environmental Research*, 50, 1-5: 63-64

Perko D., Oražen Adamič M. 2001. Slovenija, pokrajine in ljudje. 3. izdaja. Ljubljana, Mladinska knjiga: 735 str.

Plut D. 1987. Slovenija - zelena dežela ali pustinja?. Ljubljana, Knjižnica revolucionarne teorije: 237 str.

Plut D. 1988. Belokranjske vode. Novo mesto, Dolenjski muzej: 199 str.

Poboljšaj K. 2003. Dvoživke - Amphibia. V: Živalstvo Slovenije. Sket B., Gogala, M., Kuštor V. (ur.).., Gogala, M., Kuštor, V. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 507-508

Polič S., Leskovšek H., Horvat M. 2000. PCB pollution of the karstic environment (Krupa river, Slovenia). *Acta carsologica*, 29, 1: 141-152

Polič S. 2005a. Onesnaženost in ekološke obremenitve okolja kraškega območja reke Krupe s polikloriranimi bifenili - PCB. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 146 str.

Polič S. 2005b. Poročilo o preiskavi PCB vzorcev vode in sedimenta iz reke Krupe. Ljubljana, Institut Jožef Štefan: 16 str.

Posledice vpliva PCB na okolje v Beli krajini v letu 2005. Zaključno poročilo. 2005. Novo mesto, Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto: 35 str.

Povše I. 2005. Biološka preiskava Krupe in Lahinje. Novo mesto, Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto: 8 str.

Povž M., Sket B. 1990. Naše sladkovodne ribe. Ljubljana, Mladinska knjiga: 370 str.

Pozo K., Urrutia R., Barra R., Mariottini M., Treutler H.-C, Araneda A., Focardi S. 2007. Records of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments of four remote Chilean Andean Lakes. *Chemosphere*, 66, 10: 1911–1921

Purves W. K., Sadava D., Orians G. H., Craig Heller H. 2006. *Life: The Science of Biology*. 6th edition. Sunderland, Sinauer Associates Inc: 1044 str.

Randall D., Burggren W., French K. 2002. *Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations*. 5th edition. New York, W. H. Freeman and Company: 752 str.

Rice C.P, O'Keefe P.W, Kubiak T.J. 2003. Sources, Pathways, and Effects of PCBs, Dioxins, and Dibenzofurans. V: *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd edition. Hoffman D.J., Rattner B.A., Allen Burton G., Cairns J. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 501-575

Ryan Loveridge A., Bishop C.A., Elliott J.E., Kennedy C.J. 2007. Polychlorinated biphenyls and Organochlorine Pesticides Bioaccumulated in Green Frogs, *Rana clamitans*, from the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 3: 315-318

Ross M.H., Reith E.J., Romrell L.J. 2003. *Histology. A Text and Atlas*. 4th edition. Philadelphia, Williams & Willkins: 875 str.

- Sawhney B.L. 1986. Chemistry and properties of PCBs in relation to environmental effects. V: PCBs and the Environment. Volume I. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 47-64
- Shaw G.R., Connell D.W. 1986. Factors controlling bioaccumulation of PCBs. V: PCBs and the Environment. Volume I. Waid J.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press Inc: 121-134
- Sheridan M.A., Kao Y.H. 1998. Regulation of metamorphosis-associated changes in the lipid metabolism of selected vertebrates. *American Zoologist*, 38, 2: 350-368
- Shirose L., Bishop C., Gendron A. 1996. Amphibians and Reptiles in Great Lakes Wetlands: Threats and Conservation. Minister of Supply and Services Canada, Catalogue No. En 40-222/4-1996E
http://www.on.ec.gc.ca/wildlife/factsheets/fs_amphibians-e.html (31. maj 2008)
- Sket B. 1997. Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: Proteidae) and its possible explanation. *Journal of Biogeography*, 24, 3: 263-280
- Sklarew D.S., Girvin D.C. 1987. Attenuation of polychlorinated biphenyls in soils. V: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Ware G.W., Nigg H.N., Bevenue A. (eds.). New York, Springer-Verlag: 1-41
- Sparling D.W. Ecotoxicology of organic contaminants to amphibians. V: Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Sparling D.W., Linder G., Bishop C.A. (eds.). Pensacola, SETAC: 461-495
- Suthersan S.S. 2001. Natural and enhanced remediation systems. Boca Raton, CRC Press LLC: 440 str.
- Tamakawa K. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). V: Pesticides, veterinary and other residues in food. Watson D.H. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 473-518

- Tanabe S. 1988. PCB problems in the future: Foresight from current knowledge. *Environmental Pollution*, 50, 1-2: 5-28
- Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Christian Larsen J., Rolaf van Leeuwen F.X. R., Djien Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T. 1998. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106, 12: 775-791
- Vandel A. 1965. *Biospeleology. The biology of cavernicolous animals.* Oxford, Pergamon Press: 524 str.
- Walker C.H. 2001. *Organic pollutant: an ecotoxicological perspective.* London, Taylor & Francis: 282 str.
- Weber A. 2000. Fish and amphibia. V: *Culver Ecosystems of the world: Subterranean Ecosystems.* Wilkens H., Culver D.C, Humphreys W.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 109-132
- Webber I. 2006. PCBs and Associated aromatics. V: *Encyclopedia of Environmental Science and Engineering. Volume 1 A-L.* 5th edition. Pfafflin, J. R., Ziegler, E. N. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 845-955
- Wong C.K., Chen C.J., Cheng P.C., Chen P.H. 1981. Mucocutaneous manifestations of polychlorinated biphenyls (PCB) poisoning: a study of 122 cases in Taiwan. *British Journal of Dermatology*, 107, 3: 317 - 323

7.2 DRUGI VIRI

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2008. Berkeley, California: AmphibiaWeb.

<http://amphibiaweb.org/index.html> (19. avg. 2008)

ARKive. Images of Life on Earth. 2003-2008. Wildscreen.

<http://www.arkive.org/> (19. avg. 2008)

Atlas Slovenije. 1992. 2. izdaja. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 383 str.

Direktiva Sveta 92/43/EEC z dne 21. maja 1992 o ohranjanju naravnih habitatov in prostoživečih živalskih in rastlinskih vrst. Ur.l. EU št. L 206/92

Direktiva Sveta 98/83/ES z dne 3. novembra 1998 o kakovosti vode, namenjene za prehrano ljudi. Ur.l. EU št. L 330/98

Drinking Water Contaminants. 2008. US Environmental Protection Agency. (5. jun. 2008).

<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html#1> (14. jun. 2008)

FDA - Food and Drug Administration USA. Unavoidable contaminants in food for human consumption and food-packaging material. 1977. (1. apr. 2007)

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=109>
(18. avg. 2008)

Geopedia.si. 2008. Društvo za digitalizacijo Slovenije, Geopedia.

<http://www.geopedia.si> (22. jun. 2008)

IUCN, Conservation International, and NatureServe. 2006. Global Amphibian Assessment. (maj 2006)

<http://www.globalamphibians.org> (31. maj 2008)

Pezdiric M. Določanje vsebnosti ... PCB v človeških ribicah ... in v sedimentu s področja reke Krupe.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2008

Mackay D. 1985. Air water exchange coefficients. V: Environmental Exposure from
Chemicals. Neely W. B., Blau G. E. (eds.) 1985. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 91-108

Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. Ur. l. RS št.
82/2002

Pravilnik o zaščiti vodozemaca (Amphibia). 1999. Narodne novine, Kl. 612-07/99-24/120,
Ur.br.: 542-08-VM-99-5.

Sket B., Gogala M., Kuštor V. 2003. Živalstvo Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba
Slovenije: 664 str.

Table of PCB Species by Congener Number. 2003. EPA (20. feb. 2008)
<http://www.epa.gov/pcbs/pubs/congenertable.pdf> (5. apr. 2008)

ZAHVALA

Mentorju **prof. dr. Borisu Bulogu**, somentorici **doc. dr. Ester Heath** in recenzentki **doc. dr. Zvonki Jeran** se zahvaljujem za vse pripombe pri izdelavi, za temeljit ter hiter pregled diplomskega dela.

Hvala predsednici komisije za zagovor **prof. dr. Alenki Gaberščik**, ki si je na zame pomemben dan utrgala čas.

Največja zahvala gre **Silvi Perko**. Brez njene pomoči v laboratoriju in nasvetov pri pregledu diplomskega dela mi ne bi uspelo.

Matjažu, Romanu in **Frenku** za potope.

Družini Absec iz Krue za nepogrešljiv pripomoček - čoln.

dr. **Lilijani Bizjak Mali** in **Katji Zdešar Kotnik** za pomoč in vzpodbudo na začetku.

Davidu Heathu za pregled angleškega izvlečka.

g. Jožetu in **g. Ivanu** iz Ribiške družine Metlika.

Mihu in **Tadeji** za koristne nasvete.

Evi in **Tini** za popestritev laboratorijskih dni in ves smeh. ☺

Moji **Maji**, za potrpežljivo prenašanje.

Sestri za vztrajno podajanje kemijskega znanja. ☺

Ne nazadnje **staršem**, ki so me vzpodbujali in omogočili, da sem prišel tako daleč.

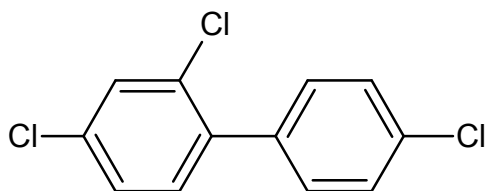
Priloga A

Označevanje PCB zvrsti (Table of PCB ... , 2003)

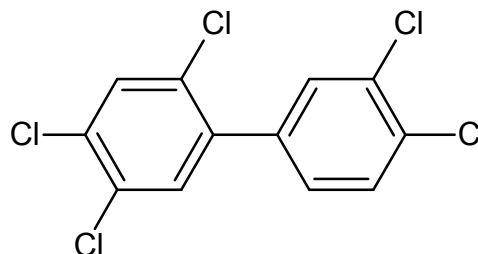
št.	IUPAC ime	št.	IUPAC ime	št.	IUPAC ime	št.	IUPAC ime
	<i>monoklorobifenili</i>	52	2,2',5,5'-tetraklorobifenil	106	2,3,3',4,5-pentaklorobifenil	160	2,3,3',4,5,6-heksaklorobifenil
1	2-klorobifenil	53	2,2',5,6'- ...	107	2,3,3',4',5- ...	161	2,3,3',4,5',6- ...
2	3- ...	54	2,2',6,6'- ...	108	2,3,3',4,5'- ...	162	2,3,3',4',5,5'- ...
3	4- ...	55	2,3,3',4- ...	109	2,3,3',4,6- ...	163	2,3,3',4',5,6- ...
	<i>diklorobifenili</i>	56	2,3,3',4'- ...	110	2,3,3',4',6- ...	164	2,3,3',4',5',6- ...
4	2,2'-diklorobifenil	57	2,3,3',5- ...	111	2,3,3',5,5'- ...	165	2,3,3',5,5',6- ...
5	2,3- ...	58	2,3,3',5'- ...	112	2,3,3',5,6- ...	166	2,3,4,4',5,6- ...
6	2,3'- ...	59	2,3,3',6- ...	113	2,3,3',5',6- ...	167	2,3',4,4',5,5'- ...
7	2,4- ...	60	2,3,4,4'- ...	114	2,3,4,4',5- ...	168	2,3',4,4',5',6- ...
8	2,4'- ...	61	2,3,4,5- ...	115	2,3,4,4',6- ...	169	3,3',4,4',5,5'- ...
9	2,5- ...	62	2,3,4,6- ...	116	2,3,4,5,6- ...		<i>heptaklorobifenili</i>
10	2,6- ...	63	2,3,4',5- ...	117	2,3,4',5,6- ...	170	2,2',3,3',4,4',5-heptaklorobifenil
11	3,3'- ...	64	2,3,4',6- ...	118	2,3',4,4',5- ...	171	2,2',3,3',4,4',6- ...
12	3,4- ...	65	2,3,5,6- ...	119	2,3',4,4',6- ...	172	2,2',3,3',4,5,5'- ...
13	3,4'- ...	66	2,3',4,4'- ...	120	2,3',4,5,5'- ...	173	2,2',3,3',4,5,6- ...
14	3,5- ...	67	2,3',4,5- ...	121	2,3',4,5',6- ...	174	2,2',3,3',4,5,6'- ...
15	4,4'- ...	68	2,3',4,5'- ...	122	2,3,3',4',5'- ...	175	2,2',3,3',4,5',6- ...
	<i>triklorobifenili</i>	69	2,3',4,6- ...	123	2,3',4,4',5'- ...	176	2,2',3,3',4,6,6'- ...
16	2,2',3-triklorobifenil	70	2,3',4',5- ...	124	2,3',4',5,5'- ...	177	2,2',3,3',4,5,6'- ...
17	2,2',4- ...	71	2,3',4',6- ...	125	2,3',4',5',6- ...	178	2,2',3,3',5,5',6- ...
18	2,2',5- ...	72	2,3',5,5'- ...	126	3,3',4,4',5- ...	179	2,2',3,3',5,6,6'- ...
19	2,2',6- ...	73	2,3',5',6- ...	127	3,3',4,5,5'- ...	180	2,2',3,4,4',5,5'- ...
20	2,3,3'- ...	74	2,4,4',5- ...		<i>heksaklorobifenili</i>	181	2,2',3,4,4',5,6- ...
21	2,3,4- ...	75	2,4,4',6- ...	128	2,2',3,3',4,4'-heksaklorobifenil	182	2,2',3,4,4',5,6'- ...
22	2,3,4'- ...	76	2,3',4',5'- ...	129	2,2',3,3',4,5- ...	183	2,2',3,4,4',5',6- ...
23	2,3,5- ...	77	3,3',4,4'- ...	130	2,2',3,3',4,5'- ...	184	2,2',3,4,4',6,6'- ...
24	2,3,6- ...	78	3,3',4,5- ...	131	2,2',3,3',4,6- ...	185	2,2',3,4,5,5',6- ...
25	2,3',4- ...	79	3,3',4,5'- ...	132	2,2',3,3',4,6'- ...	186	2,2',3,4,5,6,6'- ...
26	2,3',5- ...	80	3,3',5,5'- ...	133	2,2',3,3',5,5'- ...	187	2,2',3,4',5,5',6- ...
27	2,3',6- ...	81	3,4,4',5- ...	134	2,2',3,3',5,6- ...	188	2,2',3,4',5,6,6'- ...
28	2,4,4'- ...		<i>pentaklorobifenili</i>	135	2,2',3,3',5,6'- ...	189	2,3,3',4,4',5,5'- ...
29	2,4,5- ...	82	2,2',3,3',4-pentaklorobifenil	136	2,2',3,3',6,6'- ...	190	2,3,3',4,4',5,6- ...
30	2,4,6- ...	83	2,2',3,3',5- ...	137	2,2',3,4,4',5- ...	191	2,3,3',4,4',5',6- ...
31	2,4',5- ...	84	2,2',3,3',6- ...	138	2,2',3,4,4',5'- ...	192	2,3,3',4,5,5',6- ...
32	2,4',6- ...	85	2,2',3,4,4'- ...	139	2,2',3,4,4',6- ...	193	2,3,3',4',5,5',6- ...
33	2,3',4'- ...	86	2,2',3,4,5- ...	140	2,2',3,4,4',6'- ...		<i>oktaklorobifenil</i>
34	2,3',5'- ...	87	2,2',3,4,5'- ...	141	2,2',3,4,5,5'- ...	194	2,2',3,3',4,4',5,5'-oktaklorobifenil
35	3,3',4- ...	88	2,2',3,4,6- ...	142	2,2',3,4,5,6- ...	195	2,2',3,3',4,4',5,6- ...
36	3,3',5- ...	89	2,2',3,4,6'- ...	143	2,2',3,4,5,6'- ...	196	2,2',3,3',4,4',5,6'- ...
37	3,4,4'- ...	90	2,2',3,4',5- ...	144	2,2',3,4,5',6- ...	197	2,2',3,3',4,4',6,6'- ...
38	3,4,5- ...	91	2,2',3,4',6- ...	145	2,2',3,4,6,6'- ...	198	2,2',3,3',4,5,5',6- ...
39	3,4',5- ...	92	2,2',3,5,5'- ...	146	2,2',3,4',5,5'- ...	199	2,2',3,3',4,5,5',6'- ...
	<i>tetraklorobifenili</i>	93	2,2',3,5,6- ...	147	2,2',3,4',5,6- ...	200	2,2',3,3',4,5,6,6'- ...
40	2,2',3,3'-tetraklorobifenil	94	2,2',3,5,6'- ...	148	2,2',3,4',5,6'- ...	201	2,2',3,3',4,5',6,6'- ...
41	2,2',3,4- ...	95	2,2',3,5',6- ...	149	2,2',3,4',5',6- ...	202	2,2',3,3',5,5',6,6'- ...
42	2,2',3,4'- ...	96	2,2',3,6,6'- ...	150	2,2',3,4',6,6'- ...	203	2,2',3,4,4',5,5',6- ...
43	2,2',3,5- ...	97	2,2',3,4',5'- ...	151	2,2',3,5,5',6- ...	204	2,2',3,4,4',5,6,6'- ...
44	2,2',3,5'- ...	98	2,2',3,4',6'- ...	152	2,2',3,5,6,6'- ...	205	2,3,3',4,4',5,5',6- ...
45	2,2',3,6- ...	99	2,2',4,4',5- ...	153	2,2',4,4',5,5'- ...		<i>nonaklorobifenil</i>
46	2,2',3,6'- ...	100	2,2',4,4',6- ...	154	2,2',4,4',5,6'- ...	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonaklorobifenil
47	2,2',4,4'- ...	101	2,2',4,5,5'- ...	155	2,2',4,4',6,6'- ...	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'- ...
48	2,2',4,5- ...	102	2,2',4,5,6'- ...	156	2,3,3',4,4',5- ...	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'- ...
49	2,2',4,5'- ...	103	2,2',4,5',6- ...	157	2,3,3',4,4',5'- ...	209	dekaklorobifenil
50	2,2',4,6- ...	104	2,2',4,6,6'- ...	158	2,3,3',4,4',6- ...		
51	2,2',4,6'- ...	105	2,3,3',4,4'- ...	159	2,3,3',4,5,5'- ...		

Priloga B

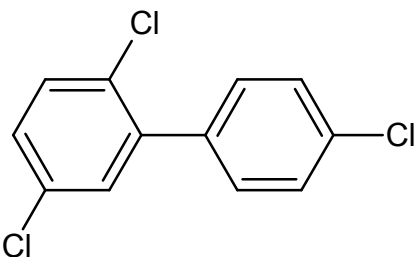
Strukturne formule izbranih PCB



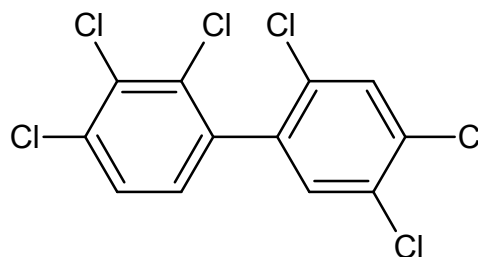
PCB 28 (2,4,4'-triklorobifenil)



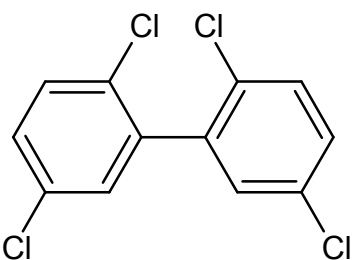
PCB 118 (2,3',4,4',5-pentaklorobifenil)



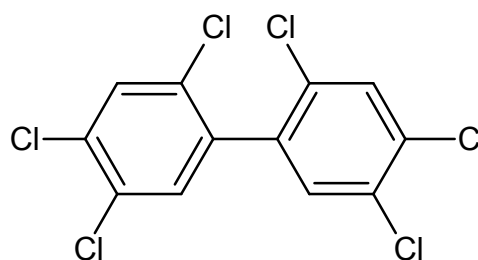
PCB 31 (2,4',5-triklorobifenil)



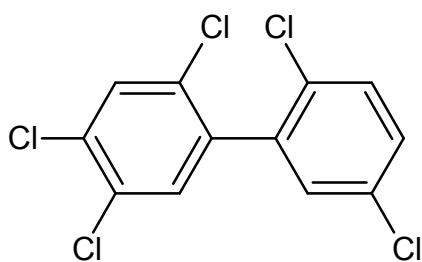
PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-heksaklorobifenil)



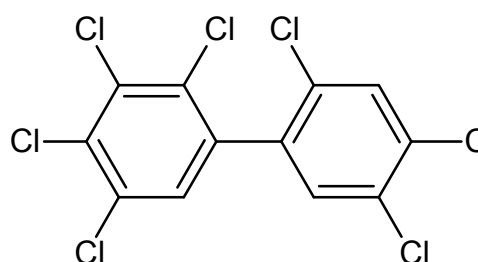
PCB 52 (2,2',5,5'-tetraklorobifenil)



PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil)



PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentaklorobifenil)



PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptaklorobifenil)

Pezdir M. Določanje vsebnosti ... PCB v človeških ribicah ... in v sedimentu s področja reke Krpe.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2008
