

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milenka Lj. Božanić

**PRAĆENJE UTICAJA PASTRMSKOG
RIBNJAKA NA NIVO AKTIVNOSTI
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA KOD
LARVE *EPHEMERA DANICA* (INSECTA,
EPHEMEROPTERA)**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Milenka Lj. Božanić

**MONITORING THE EFFECTS OF TROUT
FARMS ON THE ANTIOXIDATIVE
ENZYME ACTIVITY LEVEL IN
EPHEMERA DANICA LARVAE (INSECTA,
EPHEMEROPTERA)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

Dr Ivana Živić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Dajana Todorović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

Dr Katarina Stojanović, docent,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Zoran Marković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju, Instituta za zoologiju, Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta, uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. TR 31075).

Najpre bih želela da se zahvalim svom mentoru **prof. dr Ivani Živić**, na ukazanom poverenju, podršci, sugestijama i pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije. Hvala Vam na pruženoj šansi da zakoračim u svet nauke i što ste verovali u mene, čak i onda kada sama u sebe nisam.

Dr Dajani Todorović veliko hvala na smernicama i savetima koji su doprineli poboljšanju ove doktorske disertacije. Hvala Vam na pomoći pruženoj u obradi eksperimentalnog materijala.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Katarini Stojanović**, kolegici, ali pre svega drugarici na savetima i podršci kako u profesionalnom tako i u ličnom smislu. Hvala na strpljenju i izdvojenom vremenu za svako moje pitanje, i na prilici da učim od tebe.

Prof. dr Zoranu Markoviću veliko hvala na ukazanom poverenju da budem deo njegovog istraživačkog tima. Hvala Vam na konstruktivnim sugestijama i savetima prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Miroslavu Živiću dugujem veliku zahvalnost na trudu i pomoći prilikom statističke obrade podataka, kao i utrošenom vremenu za diskusiju o rezultatima doktorske teze.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu, Odeljenja za biohemiju i fiziologiju insekata Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” i iz Agencije za zaštitu životne sredine u Beogradu na pomoći prilikom eksperimentalne izrade doktorske disertacije.

Hvala kolegama **Jeleni Đuknić** i **Borisu Novakoviću** na pomoći prilikom determinacije dela materijala.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju, Instituta za zoologiju, Biološkog fakulteta na pomoći i savetima kada god je bilo potrebno.

Kolegama sa projekta **Marku, Ljubici, Zorici i Dači**, hvala što ste znali da uskočite u pomoć kad god je bilo potrebno. Hvala vam i na uvek dobrom raspoloženju i smehu u trenucima odmora.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj drugarici **Danijeli Vidaković** što je uvek bila odan i pravi prijatelj kroz sve ove godine našeg druženja i za безусловnu pomoć kad god je to bilo potrebno.

Hvala mojoj **kumi Magdaleni** što je uvek bila tu za mene i uz mene.

Hvala mojim drugaricama **Mikavici, Dijani i Danki** što su bile tu kao podrška.

Mojoj sestri Ljilji dugujem veliku zahvalnost za svu ljubav i podršku, za razumevanje i za najbolje savete kad god je bilo potrebno. Hvala ti što si uvek verovala u mene!

Hvala tetkinoj Višnji, unela si radost u moj život!

Veliko hvala dugujem mom suprugu Aci. Hvala ti na ljubavi koju mi nesebično pružaš svakog dana i što mi uvek vraćaš osmeh na lice, što si sa mnom i uz mene i kada je lako i kada je teško.

Hvala mojim najvećim ljubavima, mojoj Dunji i mom Filipu. Vi ste došli u moj život u toku izrade ove disertacije i ispunili ga srećom i radošću, i dali mi snage da istrajem. Vi ste moj ponos i dajete svemu smisao!

Disertaciju posvećujem svojim roditeljima mami Mikici i tati Ljubu. Hvala vam što ste uvek bili tu za mene kao najveća podrška i oslonac tokom čitavog života. Naučili ste me pravim životnim vrednostima i da upornošću i istrajnošću mogu da ostvarim šta god poželim. Hvala vam za neizmernu ljubav koju ste mi pružili i koju mi i dalje pružate. Bez vas ne bih uspela.

Autor

*Posvećeno mojim roditeljima,
mami Mikici i tati Ljubu*

Praćenje uticaja pastrmskog ribnjaka na nivo aktivnosti antioksidativnih enzima kod larve *Ephemera danica* (Insecta, Ephemeroptera)

Sažetak

U monitoringu površinskih voda neophodno je pored praćenja abiotičkih faktora uključiti i biotičku komponentu tj. analizirati sastav i strukturu zajednica vodenih organizama. Da bi se dobila kompletnija slika o stanju vodenog ekosistema koriste se organizmi bioindikatori. Larva *Ephemera danica* ima specifične morfološke i funkcionalne karakteristike te je pogodan model organizam za studije biomonitoringa.

Cilj doktorske disertacije je praćenje uticaja ispusnih voda pastrmskog ribnjaka na nivo aktivnosti enzima antioksidativne zaštite kod larvi *E. danica*, ispitivanje stepena bioakumulacije teških metala u telu larvi, vodi i sedimentu reke Skrapež, utvrđivanje faunističkog sastava makrozoobentosa istraživane tekućice.

Hidrobiološka istraživanja reke Skrapež sprovedena su tokom 2015. (proleće, leto i jesen) i 2016. godine (zima) na jednom lokalitetu iznad i tri lokaliteta nizvodno od pastrmskog ribnjaka.

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da aktivnost SOD karakteriše veća sezonska varijabilnost, aktivnost GPx karakteriše značajnija longitudinalna varijabilnost i u svim sezonama dolazi do statistički značajnog porasta aktivnosti GPx na drugom lokalitetu, što ukazuje da organsko zagađenje poreklom sa ribnjaka indukuje oksidativni stres kod vrste *E. danica*. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) dostiže maksimum u jesen na drugom lokalitetu, što je negativan uticaj pastrmskog ribnjaka.

Analiza CIA je pokazala postojanje statistički značajne kostrukture između PCA korelacione matrice koncentracija teških metala u sedimentu i u telu *E. danica*.

Indeks saprobnosti ukazuje na uticaj ribnjaka kroz pogoršanje kvaliteta vode nizvodno od njega. Njegov uticaj je i u smanjenju procenta sekača nizvodno od ribnjaka, a povećanju sakupljača, aktivnih i pasivnih sakupljača filtratora.

Ključne reči: pastrmski ribnjak, *E. danica*, makrozoobentos, biomonitoring, antioksidativna odbrana, bioakumulacija teških metala, biotički indeksi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija životinja

Monitoring the effects of trout farms on the antioxidative enzyme activity level in *Ephemera danica* larvae (Insecta, Ephemeroptera)

Abstract

In monitoring surface waters, in addition to abiotic factors, it is necessary to include the biotic component, i.e., to analyse the composition and structure of communities of aquatic organisms. Bioindicator organisms are used to get a more complete picture of the state of an aquatic ecosystem. The larva of *Ephemera danica* has specific characteristics that make it a suitable model organism for biomonitoring studies.

The purpose of the doctoral dissertation was to monitor the influence of outlet water of a trout farm on the level of activity of antioxidative defense enzymes in larvae of *E. danica*; test the degree of bioaccumulation of heavy metals in the body of larvae, water, and sediment, and establish faunistic composition of the macrozoobenthos.

Hydrobiological investigation of the Skrapež River was conducted during 2015 (spring, summer, and fall) and 2016 (winter) at one locality upstream from the trout farm and three localities downstream from it.

Two-factor analysis of variance showed that SOD activity is characterized by high seasonal variability, GPx activity is characterized by considerable longitudinal variability, and a statistically significant increase of GPx activity occurs in all seasons at the second locality, which indicates that organic pollution originating from the fish farm induces oxidative stress in the species *E. danica*. The concentration of total glutathione (GSH) attains a maximum in the fall at the second locality, which is a negative effect of the trout farm.

Use of CIA revealed the existence of a statistically significant contracture between PCA of the correlation matrix of heavy metal concentrations in the sediment and in the body of *E. danica*.

The saprobity index indicates influence of the fish farm in the form of a worsening of water quality downstream from it. Influence of the fish farm manifested in a decrease in the choppers at localities downstream from it, and an increase in the gatherers (active and passive gatherer-filterers).

Key words: trout farm, *E. danica*, macrozoobenthos, biomonitoring, antioxidative defence, bioaccumulation of heavy metals, biotic indexes

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Morphology, systematics, and phylogeny of animals

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biomonitoring, bioindikatori i biomarkeri.....	4
1.1.1. Biomonitoring.....	4
1.1.2. Bioindikatori.....	5
1.1.3. Biomarkeri.....	6
1.2. Pastrmski ribnjaci i njihov uticaj na brdsko-planinske reke.....	7
1.3. Oksidacioni stres i sistem antioksidativne zaštite.....	9
1.4. Bioakumulacija metala.....	12
1.5. Larva <i>Ephemera danica</i> (Müller, 1764) model organizam-opšte karakteristike.....	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJAL I METODE	19
3.1. Opšte karakteristike istraživanog područja.....	20
3.1.1. Geološke karakteristike, reljef i vegetacija sliva reke Skrapež.....	20
3.1.2. Klimatske karakteristike rečnog sliva.....	21
3.1.3. Opis ribnjaka i istraživanih lokaliteta.....	21
3.2. Fizički i hemijski parametric.....	26
3.2.1. Metode za određivanje fizičkih parametara vode.....	26
3.2.2. Metode za određivanje hemijskih parametara vode.....	27
3.3. Određivanje koncentracije metala u sedimentu, vodi i u telu larve <i>E. danica</i>	28
3.3.1. Analiza sedimenta i vode na prisustvo teških metala.....	28
3.3.2. Faktor kontaminacije (CF) sedimenta.....	30
3.3.3. Biota-sediment faktor akumulacije.....	30
3.3.4. Određivanje sadržaja teških metala u telu <i>Ephemera danica</i>	30
3.4. Određivanje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GPx i količine ukupnog glutaciona GSH.....	31
3.4.1. Određivanje koncentracije proteina.....	32
3.4.2. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD).....	32
3.4.3. Određivanje aktivnosti enzima glutacion peroksidaze (GPx).....	33

3.4.4. Određivanje količine ukupnog glutationa (GSH).....	33
3.5. Analiza zajednica makrozoobentosa.....	34
3.5.1. Prikupljanja i identifikacije uzoraka makrozoobentosa.....	34
3.5.2. Primena različitih indeksa u analizi zajednica makroinvertebrata.....	35
3.6. Statističke analize podataka.....	37
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	39
4.1. Rezultati bioloških analiza.....	40
4.1.1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež.....	40
4.1.2. Kvantitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež.....	42
4.2. Uticaj ribnjaka na fizičke i hemijske parametare vode reke Skrapež.....	45
4.3. Uticaj pastrmskog ribnjaka na sistem antioksidativne zaštite larve <i>E. danica</i>	47
4.4. Uporedna analiza sistema antioksidativne zaštite i fizičkih i hemijskih parametara vode.....	52
4.5. Analiza teških metala u telu larve <i>E. danica</i> , vodi i sediment.....	55
4.5.1. Uporedna analiza koncentracija teških metala u sedimentu, vodi i telu larve <i>E. danica</i> izražene preko BSAF faktora.....	59
4.5.2. Faktor kontaminacije sedimenta (CF).....	65
4.6. Rezultati ekoloških analiza.....	66
4.6.1. Analiza vrednosti saprobnog indeksa Zelinka i Marvan.....	66
4.6.2. Analiza biotičkog BMWP indeksa.....	66
4.6.3. Analiza indeksa diverziteta (Šenon- Winerov i Simpsonov indeks).....	67
4.6.4. Analiza funkcionalnih trofičkih grupa na reci Skrapež.....	68
5. DISKUSIJA.....	70
5.1. Raznovrsnost zajednica makroinvertebrata reke Skrapež.....	72
5.2. Uporedna analiza antioksidativnog sistema odbrane larve <i>E. danica</i> i fizičkih i hemijskih parametara vode.....	73
5.3. Analiza koncentracija teških metala u sedimentu i u telu larve <i>E. danica</i>	79
5.4. Biota-sediment faktor akumulacije–BSAF.....	82
5.5. Analiza koncentracija teških metala u vodi u odnosu na koncentracije u telu <i>E. danica</i>	84

5.6. Analiza metričkih osobina zajednice na istraživanoj tekućici.....	85
6. ZAKLJUČCI.....	88
7. LITERATURA.....	92
8. PRILOG.....	120
BIOGRAFIJA AUTORA.....	125

1. *UVOD*

Još je grčki historičar Herodot zabeležio u svojim tekstovima o običajima Persijanaca da „oni ne mokre u svoje reke, ne pljuju u njih, niti peru ruke u njima, a ne dopuštaju ni drugima da to čine, nego ukazuju najveće poštovanje prema rekama” (Gavrilović i Dukić, 2002). Za razliku od starih Persijanaca, današnji čovek se drugačije ophodi prema vodama (površinskim ili podzemnim), zagađujući ih na razne načine (Gavrilović i Dukić, 2002). Sa razvojem društva, vodeni tokovi su pod velikim uticajem čoveka, koji se svakodnevno intezivira, usled promene klime, urbanizacije, industrijalizacije i rasta ljudske populacije (Živić, 2005). On je svojim aktivnostima narušio ravnotežu velikog dela vodenih tokova, i te posledice se osećaju i na lokalnom i na globalnom nivou. Čovek svojim aktivnostima uslovljava manje ili veće promene abiotičkih faktora u vodenoj sredini (dolazi do promene količine rastvorenog kiseonika, pH vode, koncentracija teških metala itd.). Regulisanjem vodotokova i izgradnjom veštačkih jezera i akumulacija, prekidaju se migratorni putevi i narušava se prirodni režim biocenoza (Živić i sar., 2018). Navedene aktivnosti čoveka dovode, u zavisnosti od inteziteta delovanja, do delimičnog ili čak do potpunog iščezavanja živog sveta u vodenim ekosistemima ili do zamene postojeće biocenoze novom, koja se zbog ujednačenosti ekoloških faktora karakteriše nižim diverzitetom (Živić, 2005).

Voda je osnov života svih živih bića i mesto odakle je potekao život na našoj planeti. S obzirom da čak 71% površine planete Zemlje pokriva voda (Gleick, 1996), može se reći da je ona - plava planeta. Ali i pored toga, na dobrom delu naše planete vlada oskudica pitke vode. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, što se tiče rezervi čiste vode koja se koristi kao pijaća, situacija je već danas dosta kritična. Ujedinjene nacije su 2003. godine predvidele da će se, od tog momenta pa u narednih 20 godina, prosečne zalihe pitke vode po glavi stanovnika smanjiti čak za trećinu. Da situacija bude još alarmantnija UN su predvidele da će do 2050. godine, ukoliko se po tom pitanju ništa ne preduzme, čak sedam milijardi ljudi suočiti sa nestašicom vode. Za ljudsku populaciju najbitnija i najpotrebnija je slatka voda, ali ona zauzima svega 2,5% ukupne zapremine vode na planeti Zemlji. Najveći deo ove vode je zarobljen u ledu i glečerima (68,7%), a podzemnih voda ima 30,1%. Ostatak slatkih voda (1,2%) je zarobljen u zemljišnom permafrostu (69%), dok se u rekama i potocima nalazi svega 0,49% ove vode (Živić i

Marković, 2017).

Zbog veoma povoljnih prirodnih uslova, u našoj zemlji postoji više hiljada vodotokova, prosečne dužine 747 m/km^2 (Gavrilović i Dukić, 2002). Rečna mreža tj. njena gustina veoma je neujednačena. Svega 11 reka ima dužinu veću od 200 km, tako da preovlađuju mali i srednji vodotokovi (Gavrilović i Dukić, 2002). Međutim, bez obzira na navedene činjenice, situacija je zabrinjavajuća i kod nas. Naime, potrošnja vode u našoj zemlji je u stalnom porastu, pa se procenjuje da će dnevna potrošnja vode po stanovniku 2021. godine iznositi čak 600 litara (Gavrilović i Dukić, 2002). Prema svetskim standardima, što se tiče zaliha vode, Srbija spada u siromašnije evropske zemlje, jer godišnje po stanovniku može da obezbedi 1600 m^3 vode, što je skoro duplo manje od svetskog standarda (Gavrilović i Dukić, 2002). Potrošnja je mnogo veća u gradskim, nego u seoskim domaćinstvima. Nakon upotrebe vode u industrijske svrhe, veći deo korišćene vode, u vidu otpadnih voda, vraća se nazad u jezera i reke. One utiču na kvalitet vode samih reka i jezera i na njihov živi svet (Gavrilović i Dukić, 2002). Shodno tome, biodiverzitet slatkovodnih ekosistema značajno je narušen, što se, u manjoj ili većoj meri, manifestuje u skoro svim geografskim oblastima na zemlji (Dudgeon i sar., 2006). Značajan pad biodiverziteta može se uočiti kroz zajednice vodenih insekata koji čine bitnu komponentu svakog vodenog ekosistema, prevashodno sa stanovišta trofičkih interakcija. Zabrinjava i činjenica da je skoro 33% vrsta vodenih insekata pred izumiranjem zbog uništavanja i zagađenja njihovih staništa (Sánchez-Bayo i Wyckhuys, 2019).

U cilju sprovođenja zaštite slatkovodnih ekosistema i hidrobionata, u Evropi je formiran dokument Okvirne direktive o vodama - *Water Frame Directive* (WFD, 2000), koja navodi i određuje smernice za upravljanje vodama. Direktiva nalaže da sve vode jednog područja treba da dostignu “dobar ekološki status”. Kako je u interesu svake države dostizanje dobrog ekološkog statusa vodnih tela, neophodno je sprovoditi konstantne studije monitoringa, jer se jedino tako može dobiti uvid o uticaju čoveka na vodne resurse, a samim tim nadalje sprečiti i negativan trend zagađenja istih. Svakako, treba se voditi klauzulom koju propagira WFD: “*Voda nije komercijalni proizvod kao bilo koji drugi, već nasleđe koje se mora zaštititi, braniti i tretirati kao takvo*” (WFD, 2000).

1.1. BIOMONITORING, BIOINDIKATORI I BIOMARKERI

1.1.1. Biomonitoring

Monitoring akvatičnih ekosistema prema WFD direktivi (WFD, 2000) i propisima u domaćem zakonodavstvu (Sl. gl. RS, br. 74/2011), zasniva se na praćenju abiotičkih komponenti (fizičkih, hemijskih i hidromorfoloških parametara) i na analizi biotičke komponente, tj. na ispitivanju sastava i strukture zajednica vodenih organizama koji pružaju dodatne informacije o stanju vodenih ekosistema (Paunović i sar., 2007). Da bi se dobila kompletna slika stanja nekog akvatičnog ekosistema, neophodno je objediniti obe ove komponente, jer praćenjem samo fizičkih i hemijskih parametara možemo dobiti isključivo trenutnu sliku stanja zagađenja (Živić i sar., 2018). Zbog toga se u monitoring uključuju i akvatični organizmi koji pružaju informacije o kvalitetu vode u dužem vremenskom periodu (Živić i sar., 2002; Živić i sar., 2018). Ovakvim kompleksnim pristupom stiče se uvid o stepenu antropogenog uticaja, odnosno stepenu zagađenja, ali i kompletnija slika o uslovima u akvatičnom ekosistemu (Van der Oost i sar., 2003). S druge strane, obe komponente monitoringa omogućavaju i određivnje ekološkog statusa vodnih tela, poređenjem referentnih lokaliteta (koji se tretiraju blisko prirodnim) i lokaliteta koji su pod uticajem nekog činioca (Živić i sar., 2018).

Akvatični organizmi se u monitoringu koriste gotovo čitav vek (Kolkwitz i Marsson, 1909; Cairns i Pratt, 1993). Kolkwitz-a i Marsson-a (1909) uvode pojam saprobnog sistema kao sistema za praćenje organskog zagađenja i odgovora akvatičnih zajednica na njega. Saprobnii sistem je široko korišćen zbog svoje jednostavne primene od polovine prošlog veka, kada je kvantifikovan kroz saprobne indekse (Pantle i Buck, 1955; Zelinka i Marvan, 1961). Međutim, ovaj sistem ima i neke nedostatke (identifikacija do nivoa vrste, registruje samo jedan tip zagađenja, itd.), pa je često kritikovan, i u današnje vreme se ređe koristi bez dodatnih analiza (Washington, 1984, Cao i sar., 1996). Danas su sve više u upotrebi drugi indeksi, kao što su: indeksi diverziteta, biotički indeksi, indeksi dominantnosti, trofički indeksi (Bain i sar., 2000). Za razliku od saprobioloških analiza, ovi indeksi opisuju stanje zajednica kroz nekoliko strukturno-analitičkih karakteristika kao što su gustina populacija, broj vrsta, dominantnost, diverzitet. Korišćenje različitih indeksa

diverziteta, u biomonitoringu kopnenih voda, zasniva se na praćenju celokupnog diverziteta (Shannon i Wiener, 1949) ili se pak analiziraju dve njegove komponente: broj vrsta i ujednačenost brojnosti (Simpson, 1949). U monitoringu tekućica se često koriste biotički indeksi (Norris i Georges 1993; Norris i Norris 1995), koji predstavljaju kombinaciju indeksa diverziteta i saprobnih sistema (Živić i sar., 2018). Međutim, biotički indeksi se mogu primenjivati samo regionalno (Tolkamp 1984, 1985; Živić i sar., 2018), zbog razlika između reka pojedinačnih zemalja i biogeografskog rasprostranjenja vrsta. Zbog toga je i najčešće korišćeni biotički indeks BMWP (Armitage i sar., 1983) modifikovan u nekoliko zemalja (Španija, Argentina, Poljska, Tajland, Paisley i sar., 2014).

1.1.2. Bioindikatori

Pošto su vodeni ekosistemi sve više izloženi različitim vidovima zagađenja, većina vodenih organizama se različitim adaptacijama prilagođava na novonastale uslove sredine (Hellowell, 2012). Međutim, vrste koje nisu u stanju da se prilagode na izmenjenu sredinu, reaguju promenom brojnosti ili biomase (Markert, 1994). Vrste, koje se nazivaju bioindikatorima, mogu se koristiti u biološkom monitoringu u zavisnosti od njihove osetljivosti na stres, tj. zagađenje (Niemi i McDonald, 2004). Na osnovu njihovog odgovora se stiče uvid u novonastalo stanje u ekosistemima, kao i o uticaju stresora na njih (Knoben i sar., 1995; Dale i Beyeler, 2001; Dziocok i sar., 2006; Pander i Geist, 2013).

Kao bioindikatori mogu se koristiti vrste, čije prisustvo ili odsustvo sa određenog staništa ukazuje da na takvom staništu vladaju određeni ekološki uslovi. Iako se u biomonitoringu mogu koristiti različite grupe organizama (bakterije, fito- i zoo-plankton, fitobentos, makrofite, ribe), u evropskim zemljama se u biomonitoringu površinskih voda najčešće koriste vodeni beskičmenjaci (Moog i sar., 2002; Bonada i sar., 2006; Carter i sar., 2006; Hellowell, 2012). Makrozoobentos se koristi u proceni uticaja čoveka na stanje akvatičnih ekosistema na svim nivoima biološke organizacije, počev od molekularnog, preko nivoa organizma pa sve do ekosistema kao celine (Resh i Jackson, 1993; Bonada i sar., 2006; Živić i sar., 2018). Organizmi makroinvertebrata imaju više osobina koje ih svrstavaju u dobre bioindikatore: dug životni vek, veći deo života provode vezani za dno,

slaba pokretljivost, važna su karika između primarnih producenata i viših trofičkih nivoa u jednom lancu ishrane, osetljivost na zagađenje, eurivalentnost i široka rasprostranjenost pojedinih oblika, veliki diverzitet, a kod nekih se organizama promene u životnoj sredini mogu pratiti i na fiziološkom nivou (Hynes, 1970; Cummins, 1974; Hellawel, 1986; Resh i Jackson, 1993; Allan, 1995; Hauer i sar., 2000; Boyero i Bailey, 2001; Lamouroux i sar., 2004). Takođe, postoje i neki tehnički razlozi koji ovoj grupi organizama daju prednost u monitoringu u odnosu na druge vodene organizme: jednostavne metode uzimanja uzoraka uz korišćenje relativno jeftine opreme, dostupnost ključeva za identifikaciju, u većini slučajeva relativno dobro proučena taksonomija grupa, a metode koje se koriste za uzorkovanje su standardizovane i imaju visok stepen pouzdanosti (Resh i Jackson, 1993; Živić i sar., 2018).

1.1.3. Biomarkeri

Dok se bioindikatorom smatra organizam koji daje određene informacije o stanju životne sredine u kojoj se nalazi, biomarkeri predstavljaju subletalne biohemijske promene koje se mogu dešavati na molekularnom, ćelijskom ili fiziološkom nivou jedinke, a koje su posledica izlaganja jedinke zagađivačima (Hyne i Maher, 2003) ili prisustva štetnih materija u njihovom okruženju (Peakall, 1994; Štajn i sar., 2007). Molekularni biomarkeri predstavljaju i najraniji odgovor jedinke na prisustvo toksikanata, tako da oni predstavljaju rani upozoravajući signal da se nešto promenilo u akvatičnom ekosistemu (Štajn i sar., 2007).

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji WHO (1993), biomarkeri se dele na biomarkere izlaganja, biomarkere efekta i biomarkere osetljivosti. Biomarkeri izloženosti podrazumevaju merenje koncentracije jedinjenja u samoj ćeliji, a koji nastaju u reakciji sa ciljnim molekulom. U ove biomarkere spada i bioakumulacija određenih supstanci u jedinkama. Biomarkeri efekta podrazumevaju merljive promene koje se dešavaju na fiziološkom ili biohemijskom nivou. Biomarkeri osetljivosti predstavljaju sposobnost organizma da odgovori na izloženost nekom zagađivaču, a može biti stečena ili prirodna. Da bi se biomarkeri uspešno koristili, neophodno je da ispunjavaju određene karakteristike,

kao što su: osetljivost na stres na ćelijskom ili molekularnom nivou, da se oštećenja nastala od zagađivača mogu pokazati i na nivou tkiva, da daju informacije o reproduktivnim sposobnostima jedinke i njihovom kapacitetu da prežive, tj. da su osetljivi na stres na nivou organizma (Viarengo i sar., 2007).

Praćenjem molekularno-fiziološkog odgovora jedinki na zagađivače u njihovom okruženju, primećene su promene u aktivnosti enzima oksidativnog stresa (Livingstone, 2003) koji predstavljaju jedne od češće korišćenih molekularnih biomarkera (Živić i sar., 2018). Značajne varijacije u aktivnosti ovih enzima uočene su pri poređenju jedinki koje su uzorkovane sa referentnih lokaliteta u odnosu na lokalitete koji su zagađeni (Stoliar i Lushchak, 2012).

S obzirom na to da je primena biomarkera u biomonitoringu tekućih i stajaćih voda na početku svog razvoja, neopravdano je očekivati da oni zamene postojeće metode u biomonitoringu, ali svakako da studije koje se bave odgovorom jedinki na oksidativni stres kroz sistem antioksidativne odbrane treba da budu što više zastupljene, kako bi se što bolje procenio efekat toksičnih supstanci u životnom okruženju (Lushchak, 2011; Živić i sar., 2018). U Srbiji je poslednjih godina primena biomarkera u biomonitoringu na osnovu makroinvertebrata u naglom porastu, i prvenstveno se ispituje odgovor enzima oksidativnog stresa na različite tipove antropogenih uticaja (Despotović i sar., 2012; Vranković i Slavić, 2015; Vranković 2015, 2016; Mirčić i sar., 2016; Božanić i sar., 2018; Vranković i sar., 2018; Radojević i sar., 2019).

1.2. PASTRMSKI RIBNJACI I NJIHOV UTICAJ NA BRDSKO-PLANINSKE REKE

Na brdsko-planinske tekućice koje predstavljaju osetljive vodene ekosisteme, sve veći uticaj ima čovek sa svojim aktivnostima kao što su intezivna poljoprivreda, eksploatacija rudnika, vodosnabdevanje, izgradnja malih hidroelektrana kao i otpadne vode koje tu dospevaju sa okolnih farmi spiranjem (Gavrilović i Dukić, 2002; Estevez i sar., 2017). Planinske reke se smatraju vodenim tokovima koji su najmanje remećeni, međutim pastrmski ribnjaci koji se sve više grade na njima imaju na njih veoma veliki uticaj, jer za

gajenje pastrmke pogodan je ovakav tip vode (Woynarovich i sar., 2011). Izgradnja pastrmskih ribnjaka predstavlja profitabilnu granu poljoprivrede što je uslovalo povećanje interesa za njihovu izgradnju (Marković i sar., 2009). Procenjuje se da u Srbiji ima oko 130 pastrmskih ribnjaka, koji zauzimaju površinu od 14 hektara. Ukupna proizvodnja pastrmke u našoj zemlji je u periodu od 2010. do 2016. godine bila od 1200 do preko 1700 t godišnje (25% mlađi i 75% konzumne ribe), odnosno od 10 do 20 kgm⁻³ zapremine bazena na pastrmskim ribnjacima, što je veoma mala vrednost. Neki pastrmski ribnjaci (uglavnom malih proizvodnih površina) imaju proizvodnju i znatno iznad 50 kgm⁻³ (Marković i sar., 2011; Stojanović i sar., 2019).

Sam proces gajenja ribe u ribnjacima podrazumeva unošenje agenasa iz spoljašnje sredine, a u cilju višestrukog povećanja ihtiomasu po jedinici površine. To se postiže dodatnom prihranom koja za posledicu ima povećanje zagađenja recipijenta tako da za kratko vreme dolazi do poremećaja u funkcionisanju ekosistema recipijenta (Velebit i sar., 2009), što se negativno odražava na zajednice vodenih beskičmenjaka (Stojanović, 2017). Najčešći uzročnici kontaminacije rečnog toka od strane pastrmskih ribnjaka predstavljaju neiskorišćena hrana i ekskrementi (Liao, 1970; Kronvang i sar., 1993; Iversen, 1995; Boyd, 2003; Namin i sar., 2013). S obzirom na to da se vode iz ribnjaka nakon korišćenja ispuštaju u recipijent i to najčešće bez prethodnog tretmana taloženja i prečišćavanja (Marković i Poleksić, 2011), primarno dolazi do pogoršanja kvaliteta vode, kao i strukture dna recipijenta (Weston i sar., 1996). Zbog toga je neophodno vršiti konstantan monitoring uticaja ispusnih voda na recipijent, pa se pored tradicionalnih hemijskih analiza sve više koriste zajednice makroinvertebrata (Bonada i sar., 2006; Carter i sar., 2006; Živić i sar., 2009; 2009a; Al-Shami i sar., 2010; Hellowell, 2012). Međutim, efekat pastrmskih ribnjaka na živi svet retko je ispitivan na molekularnom nivou, koji najčešće podrazumeva praćenje aktivnosti antioksidativnih enzima koji mogu ukazati na povećanje oksidativnog stresa u organizmu usled promena u njegovom okruženju. Kada je reč o larvama vodenih insekata, ovakva istraživanja su na samom početku (Choi i sar., 1999; Berra i sar., 2004; Barata i sar., 2005; Mirčić i sar., 2016; Božanić i sar., 2017; Radojević i sar., 2017, 2019). Međutim, pažnja istraživača se sve više usmerava na ovakva istraživanja s obzirom na to da otvaraju mogućnost predviđanja efekata zagađenja na populacije, kroz odgovor

pojedinačnih jedinki na stres, jer je poznato da se odgovor na prisustvo zagađivača ranije javlja na nivou organizama nego na nivou cele zajednice (Gremyatchikh i sar., 2009; Al-Shami i sar., 2010). Stoga se korišćenjem molekularnih biomarkera u studijama biomonitoringa akvatičnih ekosistema mogu otkriti rani signali koji ukazuju na promene u životnoj sredini (Božanić i sar., 2018; Živić i sar., 2018).

S obzirom na to da Srbija ima povoljan geografski položaj za uzgoj slatkododne pastrmke (Stojanović i sar., 2019), i uzimajući u obzir isplativost njenog gajenja (Marković i sar., 2009), za očekivati je da će se u našoj zemlji u narednom periodu povećavati broj pastrmskih ribnjaka. Stoga je neophodno posebnu pažnju obratiti na zagađenje koje nastaje kao posledica izliva otpadnih voda iz ribnjaka u reke na kojima se oni podižu i sprovesti istraživanja koja su i predmet ove disertacije.

1.3. OKSIDATIVNI STRES I SISTEM ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Kod svih aerobnih organizama, kao posledica oksidativnog metabolizma, javljaju se reaktivne vrste kiseonika, ROS (Ahmad, 1995). Zbog štetnog dejstva i biološke aktivnosti, njihov metabolizam je pod stalnom kontrolom, te njegova koncentracija obično ne prelazi 10^{-8} M (Lushchak, 2011). U normalnim uslovima, u ćelijama/tkivima postoji ravnoteža između produkcije i eliminacije ROS, od strane različitih antioksidativnih jedinjenja i enzima (Dröge, 2002). Usled promena u životnoj sredini, u prisustvu prooksidanasa dolazi do narušavanja ove ravnoteže i nastupa stanje oksidativnog stresa (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Reaktivne vrste kiseonika čine slobodni radikali i druge vrste aktiviranog kiseonika (Valavanidis i sar., 2006). Slobodni radikali u spoljašnjoj orbitali imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Zbog toga su nestabilni i u svojoj težnji da postignu elektronsku stabilnost reaguju sa drugim molekulima ili međusobno, što može dovesti do narušavanja ćelijske funkcije ili do promena biomolekula (Valko i sar., 2004). Ovi radikali mogu nastati kao posledica delovanja različitih faktora iz spoljašnje sredine, ali i u procesima koji se dešavaju u organizmima (Dröge, 2002; Halliwell i Gutteridge, 2007).

Oksidativni stres dovodi do niza poremećaja u živim sistemima kao što su:

oksidacija proteina, oštećenje DNK, lipidna peroksidacija (Sies i sar.,1985). Oksidativna oštećenja proteina izaziva hidroksil radikal (OH[•]), a narušavanje njihove funkcije može dovesti i do smrti ćelije (Almroth i sar., 2008). Reaktivne vrste kiseonika mogu da dovedu do različitih oštećenja DNK molekula kao što su razne mutacije, delecije, translokacije, prekidi DNK molekula, a navedena oštećenja mogu dovesti i do genomske nestabilnosti (Halliwell i Gutteridge, 1999b; Kryston i sar., 2011). Delovanjem ROS na lipide i ćelijske membrane, kao i druge molekule koji sadrže lipide, dolazi do lipidne peroksidacije, što za posledicu ima promenu metabolizma proteina i lipida u ćelijskim membranama (Radi i sar., 1991; Halliwell i Gutteridge, 2007).

Održavanje ravnoteže između produkcije ROS i delovanja sistema antioksidativne zaštite je od značaja za normalno funkcionisanje organizma (Halliwell i Gutteridge, 1989; Ames i sar., 1993; Lemaire i Livingstone, 1993; Halliwell i Gutteridge, 1999b) jer je ravnoteža između proizvodnje i eliminacije ROS presudna, između ostalog, i za ćelijsku homeostazu (Lemaire i Livingstone, 1993). Kada dođe do narušavanja ove ravnoteže, odnosno do oksidativnog stresa, ćelija aktivira sistem antioksidativne zaštite (Cadenas, 1989; Buonocore i sar., 2010). Ovaj sistem kod organizama neprekidno funkcioniše i ima za cilj da spreči ili popravi oštećenja nastala pod uticajem ROS.

Kod akvatičnih organizama, dobro organizovani odbrambeni antioksidativni sistem ima ulogu u zaštiti njihovih tkiva od prooksidanasa koji su prisutni u vodi i sedimentu, naročito u blizini ispusnih voda pastrmskih ribnjaka (Livingstone, 2003). Sistem antioksidativne odbrane reguliše koncentraciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u organizmima (Halliwell i Gutteridge, 2007) i obuhvata grupu antioksidanasa velike molekulske mase - specifični i nespecifični proteini koji učestvuju u odbrani organizma, i neenzimske komponente (Dröge, 2002; Morales i sar., 2014). U specifične proteine spadaju antioksidativni enzimi: superoksid dismutaza-SOD, katalaza- CAT, glutation peroksidaza - GPx, glutation reduktaza - GR, glutation S transferaza - GST i glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (Van der Oost i sar., 2003; Franco i Cidlowski, 2009). Nespecifični antioksidansi velike molekulske mase su proteini (metalotioneini i feritin) koji se vezuju za jone metala (najčešće bakar i gvožđe), i na taj način sprečavaju štetu koju izaziva ROS (Franco i Cidlowski, 2009, Mirčić, 2013). U neenzimske komponente spadaju supstance

male molekulske mase. Neke od njih su glutation, vitamin E, vitamin C, vitamin A, koenzim Q, karotenoidi i oni uglavnom sakupljaju slobodne radikale (Cadenas i sar., 1989).

Praćenje aktivnosti antioksidativnih enzima je bitno jer oni mogu ukazati na rane promene nekih faktora sredine koji dovode do oksidativnog stresa, pa samim tim se mogu koristiti kao indikatori zagađenja akvatičnih ekosistema (Valavanidis i sar., 2006). Bez obzira na to što je primena molekularnih biomarkera tek u začetku, analiza antioksidativnog stresa kod hidrobionata predstavlja izazov za studije biomonitoringa. Značaj ovakvih istraživanja je veliki jer ima mogućnost da predvidi efekte zagađenja na celokupne populacije kroz odgovor pojedinačnih jedinki na stres (Gremyatchikh i sar., 2009; Mirčić i sar., 2016;).

Superoksid dismutaza (SOD) ima značajnu ulogu u zaštiti ćelije i predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnih oštećenja izazvanih reaktivnim vrstama kiseonika. Ovaj metaloprotein katalizuje konverziju superoksid anjon radikala u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (McCord i Fridovich, 1988; Fridovich, 1995). U živom svetu postoji pet izoenzimskih formi superoksid dismutaze: gvožđe sadržavajuća superoksid dismutaza (FeSOD), nikl sadržavajuća superoksid dismutaza (NiSOD), mangan sadržavajuća superoksid dismutaza (MnSOD), bakar cink sadržavajuća superoksid dismutaza (CuZn SOD) i ekstracelularna superoksid dismutaza (EC SOD).

Glutation peroksidaza je kod eukariota prisutna u skoro svim ćelijama. Ovaj enzim katalizuje glutation-zavisnu redukciju vodonik peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole, koristeći glutation kao kofaktor (Blagojević i Grubor-Lajšić, 2000). U odnosu na enzim katalazu, glutation peroksidaza ima veći afinitet za vodonik peroksid (H_2O_2), te je važan u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama H_2O_2 , dok je katalaza (CAT) važnija pri većim koncentracijama H_2O_2 , odnosno u uslovima izrazitog oksidativnog stresa (Kruidenier i Verspaget, 2002). Glutation peroksidaza postoji u tri forme, a to su selen-zavisna glutation peroksidaza (Se GSH-Px), selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non-Se GSH-Px) i fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza (PH GSH-Px) (Halliwell i Gutteridge, 1999a).

Jedna od najznačajnijih neenzimskih komponenti antioksidativne zaštite je glutathion, tripeptid (L-glutamicil-cisteinil-glicin) koji se sintetizira iz aminokiselina cisteina, glutamata i glicina (Griffith, 1999). Glutathion je neophodan u sintezi i degradaciji proteina, redukcionim procesima, regulaciji ćelijskog redoks balansa, formiranju dezoksiribonukleotida i regulaciji aktivnosti enzima. Glutathion štiti ćelije od vodonik peroksida i organskih hidroperoksida, hidroksil radikala, organskih radikala, peroksi radikala, a učestvuje i u detoksifikaciji, regenerira neenzimske antioksidante, učestvuje u popravci oksidativnih oštećenja molekula DNK (DeLeve i Kaplowitz 1991; Anderson, 1996; Kruidenier i Verspaget, 2002). Kao kofaktor glutathion-peroksidaze i glutathion-S-transferaze indirektno učestvuje u detoksikaciji vodoničnih i lipidnih peroksida (Mates, 2000). U ćelijama je prisutan u redukovanoj formi, u vidu tiola, ili u oksidovanoj formi kao disulfid.

1.4. BIOAKUMULACIJA METALA

U velikoj raznovrsnosti fizičkih i hemijskih agenasa čije se delovanje na životnu sredinu danas intenzivno proučava, posebno se izdvajaju teški metali. U akvatične ekosisteme oni najčešće dospevaju prirodnim putem (erozijom, vulkanskom aktivnošću, ispiranjem zemljišta i stena) (Rauch i Graedel 2007; Rauch i Pacyna 2009). U poslednje vreme su za zagađenje teškim metalima odgovorni pre svega ubrzana urbanizacija i industrijalizacija (Schueler 2000; Govil i sar., 2008; Čevik i sar., 2009; Wu i sar., 2011). Veliki interes za proučavanje delovanja teških metala na organizme zasnovan je na akumuliranju otpadnih proizvoda industrijske proizvodnje u životnoj sredini (Goodyear i McNeill, 1999). Drugi važan razlog leži u činjenici da oni imaju izuzetno toksično dejstvo na akvatične i terestrične organizme, s obzirom na njihovu stabilnost u ekosistemu i transport kroz lance ishrane (Shahbaz i sar., 2013). Teški metali mogu indukovati oksidativni stres kod akvatičnih insekata, posebno ukoliko su i drugi prooksidansi prisutni u njihovom okruženju. Iako su mnogi metali esencijalni za žive organizme, jedna od njihovih loših osobina je što zbog svoje toksičnosti i povećane koncentracije u vodenim ekosistemima predstavljaju rastući problem na globalnom nivou. Naime, kada jednom

dospeju u prirodnu sredinu deponuju se i ne mogu se razgraditi do netoksičnih formi, te na taj način narušavaju ravnotežu u ekosistemu delujući na sve žive organizme, pa samim tim i na čoveka (Fernandes i sar., 2007; Snodgrass i sar., 2008; Besser i sar., 2009; Suthar i sar., 2009; Nagajyoti i sar., 2010; Abdel-Baki i sar., 2011). Mogu se deponovati i u sedimentima, u kojima se dugo zadržavaju jer su veoma postojani (Fernandes i sar., 2007; Abdel-Baki i sar., 2011). Takođe, deponuju se i u tkivima vodenih organizama, u kojima u povećanim koncentracijama prouzrokuju različite toksične efekte (Shahbaz i sar., 2013; Ezejiogr i sar., 2013).

Na stepen akumulacije metala u organizmima utiču kako njihovi fiziološki procesi, tako i karakteristike samih metala (Luoma 1983; Duffus 2002; Vicente-Martorell i sar., 2009; Sharma, 2014), ali i promene fizičkih i hemijskih činilaca životne sredine kao što su: prisustvo organske materije, pH, koncentracija kiseonika (Shulkin i sar., 2003; Vicente-Martorell i sar., 2009). Ukoliko se u rečnom sedimentu nalazi veća količina organske materije, taj sediment će za sebe vezati teške metale u većoj količini (Izquierdo i sar., 1997; Zoumis i sar., 2001; Morillo i sar., 2002; Burridge, 2010). Na taj način i vodeni organizmi, naročito makrozoobentosni organizmi koji koriste sediment u raznim fazama svog života, mogu da usvajaju veće količine ovih metala koji se bioakumuliraju u njihovom telu. Do toga dolazi jer organizam u sebe gomila znatno veću količinu teških metala nego što ih gubi, pa se na taj način oni zadržavaju u njihovom organizmu. I ishrana ima veliki uticaj na akumulaciju metala u telu beskičmenjaka i predstavlja jedan od glavnih izvora metala za mnoge vodene beskičmenjake (Wang, 2002). Samim tim, razlike u ishrani organizama bentofaune uslovljavaju i razlike u bioakumulaciji ovih elemenata u telu akvatičnih beskičmenjaka (Clements, 1991; Pourang, 1996; Corbi i sar., 2010). Akvatični beskičmenjaci su zbog osobine svog životnog ciklusa (Hellawell, 1986; Bonada i sar., 2006; De Pauw i sar., 2006) pogodni bioindikatori za praćenje stepena akumulacije teških metala kako iz tekuće vode, tako i iz rečnog sedimenta (Fialkowski i sar., 2003). Na opasnost od kontaminacije teškim metalima u najranijim fazama zagađenja mogu ukazivati i pojedinačni odgovori vodenih organizama (Gremyatchikh i sar., 2009), te je praćenje promena na nivou jedinki više informativno od analize promena na nivou zajednice za potrebe biomonitoringa vodenih ekosistema (Al-Shami i sar., 2010).

1.5. LARVA *EPHEMERA DANICA* (MÜLLER, 1764), MODEL ORGANIZAM- OPŠTE KARAKTERISTIKE

Ephemera danica, vrsta koja je široko rasprostranjena u čistim tekućicama zapadnog Paleartika, pripada redu Ephemeroptera koji obuhvata 3 045 opisanih vrsta (404 rodova i 42 familije) (Bauernfeind i Soldán, 2012). U Srbiji je ovaj red zastupljen sa 45 taksona (rodova i vrsta) iz 8 familija, mada se smatra da je njihova raznovrsnost daleko veća (Petrović i sar., 2015). Predstavljaju hemimetabolnu grupu insekata, jedinstvenu po tome što ih odlikuju dva adultna stadijuma – imago i subimago. Subimago se javlja posle poslednjeg larvalnog stupnja, ima razvijena krila i nalikuje adultu, ali nije polno zreo. Kopulacija jedinki ove vrste se odigrava u vazduhu, nakon čega mužjaci odmah ugibaju, a ženke tek nakon polaganja jaja (Bauernfeind i Soldán, 2012).

Opis: Larva *E. danica* je obično dužine od 14 do 30 mm (Slika 1). Glava je sa primetnom tamnom oznakom između očela, trouglasta ili u obliku slova T, koja povezuje bočne očele (Slika 2). Abdomen se sastoji od deset segmenata, svetlo je krem do žućkaste boje, sa crnim šarama koje su taksonomski karakter (Slika 4). Na abdomenu se lateralno nalaze trahealne škrge (Slika 3). Tergumi jedan i dva su sa nejasno definisanim tamnim bočnim mrljama, treći do peti su bez tamne šare, ili sa sitnom tamnom tačkom bočno. Tergum šest je sa parom pruga, a sedmi do deveti sa širokim crnim bočnim prugama i sa parom kraćih medijalnih uzdužnih pruga. Na kraju abdomena su dva cerka i središnji kaudalni filament (Bauernfeind i Soldan, 2012).

Biologija: Larve naseljavaju planinske reke sa kamenitim, šljunkovitim i peskovitim dnom, tj. litoralni deo potoka i reka, kao i obalu oligotrofnih jezera (Bauernfeind i Soldán, 2012). Ubušuju se u supstrat praveći tunele u obliku slova „U” i na taj način omogućavaju da vodena struja obliva njihove škrge. Usled ovakvog načina života, imaju odgovarajuće morfološke adaptacije: modifikovan usni aparat, dodatke na glavi i proraksu koji im omogućavaju kopanje tunela, dok brojne dlake preko abdomena odbijaju čvrste čestice peska i šljunka i na taj način sprečavaju da se njihovo telo ošteti (Bauernfeind i Soldan, 2012). Hrane se filtriranjem organskog detritusa (aktivni sakupljači filtratori), zbog čega su osetljive na zagađujuće materije u supstratu. Indikatori su vode

dobrog kvaliteta, na granici između oligo i beta mezosaprobnih voda, a mogu da žive u staništu sa visokim alkalitetom (100-240 mg/l kalcijum karbonata) i visokim pH vrednostima (7,9-8,5) (Svensson, 1977; Winkelmann i Koop, 2007; Bennett, 2007).



Slika 1. Larva *E. danica*,
foto M. Božanić



Slika 2. Glava larve *E. danica*,
foto M. Božanić



Slika 3. Škrge larve *E. danica*,
foto M. Božanić



Slika 4. Šara na abdomenu larve *E. danica*,
foto M. Božanić

Zbog svojih specifičnih morfoloških i funkcionalnih karakteristika (Cain i sar., 1992), *E. danica* je odabrana za model organizam. Naime, zbog ubušujućeg načina života, načina ishrane (aktivni sakupljači filtratori detritusa), relativno velikih dimenzija tela

(Clements i Kiffney, 1994), kao i zbog toga što se jedinke ove vrste mogu lako sakupiti u dovoljnom broju za analizu (Nummelin i sar., 2007), u ovom slučaju za praćenje efekta ispusnih voda pastrmskog ribnjaka. Takođe, njihov larvalni stadijum traje jednu do tri godine (Illies, 1952; Landa, 1968, Swensson, 1977), što omogućava praćenje različitih efekata zagađenja u određenom vremenskom periodu (Svensson, 1977; Winkelmann i Koop, 2007; Bennett, 2007). Takođe, larve Ephemeroptera imaju tendenciju da akumuliraju pojedine teške metale u većim koncentracijama nego drugi taksoni (Burrows i Whitton, 1983; Fialkowski i sar., 2003), te je pogodan test organizam za praćenje akumulacije teških metala iz vode i sedimenta vodenih ekosistema.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Doktorska disertacija "Praćenje uticaja pastrmskog ribnjaka na nivo aktivnosti antioksidativnih enzima kod larve *Ephemera danica* (Insecta, Ephemeroptera)" napisana je u skladu sa sledećim ciljevima:

- Praćenje uticaja kvaliteta ispusnih voda pastrmskog ribnjaka na nivo aktivnosti enzima antioksidativne zaštite kod larvi *Ephemera danica*.
- Ispitivanje prisustva teških metala u sedimentu i vodi reke Skrapež, kao i ispitivanje stepena njihove bioakumulacije u telu larvi vrste *Ephemera danica*.
- Utvrđivanje faunističkog sastava i diverziteta makrozoobentosa u reci Skrapež.
- Analiza uticaja ekoloških činilaca sredine na strukturu i dinamiku zajednica makrozoobentosa u ispitivanoj tekućici.
- Određivanje kvaliteta vode recipijenta pre i posle ispusta vode iz ribnjaka, na osnovu fizičkih i hemijskih parametara.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISTRAŽIVANOG PODRUČJA

Reka Skrapež, leva pritoka reke Đetinje, protiče kroz zapadnu Srbiju. Ukupna dužina rečnog toka iznosi 48 km, a površina sliva 743 km² (Gavrilović i Dukić, 2002). Izvire na jugoistočnim padinama planine Povlen, ispod Malog i Velikog Povlena, na 1100 metara nadmorske visine, i sastoji se od nekoliko izvorišnih krakova, od kojih je najveći Taorsko vrelo (Kovačević-Majkić, 2009). Najduža desna pritoka Skrapeža je Lužnica, a leva Dobrinjska reka (Dukić, 1962). Prosečna nadmorska visina ovog rečnog sliva je 600,76 m (Kovačević-Majkić, 2009). Dve najviše tačke u celom slivu su na 1300 m i 1346 m nadmorske visine. Najniža tačka je na 312 m nadmorske visine i predstavlja ušće Skrapeža u reku Đetinju (Dukić, 1962). Kao i većina tokova u brdsko planinskom delu Srbije, reku Skrapež u gornjem delu toka i u izvorišnom regionu odlikuje hladna voda bogata kiseonikom. Ovakva voda je pogodna za gajenje pastrmke, pa se na gornjem toku reke Skrapež nalaze dva ribnjaka za uzgoj pastrmke. Nizvodno se pogoršava kvalitet vode, što je zbog male dubine i brzine toka posebno izraženo u letnjem periodu (Kovačević-Majkić, 2009).

3.1.1. Geološke karakteristike, reljef i vegetacija sliva reke Skrapež

Sliv reke Skrapež uglavnom ima severozapadno-jugoistočni pravac, što je posledica tektonske aktivnosti. Geološki sastav sliva ove reke je veoma složen i čine ga stene, različite starosti i postanka (Kovačević-Majkić, 2009). Desna strana sliva izgrađena je od krečnjaka, škriljaca, konglomerata, peščara koji vode poreklo iz devona. Levu stranu sliva čine materije koje većinom vode poreklo iz gornje jure (Gavrilović, 1965). U gornjem i u srednjem delu sliva su zastupljeni krečnjački tereni, koji zauzimaju uske zone između magmatita na severoistoku i kristalastih škriljaca na jugozapadu. Kraški proces je zaustavljen u srednjem delu toka, u kojem su krečnjaci prekriveni neogenim nanosima (Kovačević-Majkić, 2009). Opterećena velikim količinama nanosa, reka Skrapež razara okolna plodna polja menjajući svoje korito. Skrapež se vrlo često izliva i plavi svoju okolinu na potezu od Dobrinjske reke do ušća (Gavrilović, 1965). Veliki problemi nastaju

usled procesa erozije koji se javlja u velikom delu sliva ove reke, a koji je naročito izražen na strmim padinama bez šumskog pokrivača.

Između nizijskih i visinskih zona u slivu ne postoji jasan, oštar prelaz, pa s obzirom na to nisu jasno izgrađene ni granice između fitocenoza. Što se tiče vegetacije, u slivu je najzastupljenija zeljasta vegetacija, te su usled jakog antropogenog uticaja najzastupljenije povrtarske kulture i oranice. Ponegde se uz rečni tok javljaju bagremi i vrbe, koji predstavljaju dobru zaštitu od poplava. Što se tiče šumskih zajednica, u slivu su prisutne bukva, jasika, hrast i breza i četinari poput jele, belog bora, smrče, crnog bora i kleke (Kovačević-Majkić, 2009).

3.1.2. Klimatske karakteristike rečnog sliva

Klima rečnog sliva zavisi od reljefa i njenog geografskog položaja. Sliv reke Skrapež ima umereno-kontinentalnu klimu. Blizina Panonskog basena i sam prelazak iz ravničarskih delova ka brdsko-planinskom području, utiče na geografsko-klimatske uslove. Srednja godišnja temperatura iznosi 11 °C, dok je srednja mesečna temperatura najtoplijeg meseca 21,4 °C, a najhladnijeg -0,2 °C. U proteklih dvadeset godina, srednja visina padavina je 750 mm godišnje. Najniži vodostaj je zabeležen u avgustu i septembru, a najviši, kao posledica otapanja snežnog pokrivača, tokom prolećnih meseci (Kovačević-Majkić, 2009).

3.1.3. Opis ribnjaka i istraživanih lokaliteta

Hidrobiološka istraživanja reke Skrapež sprovedena su tokom 2015. godine i to u aprilu, julu i oktobru, kao i 2016. godine u januaru. Pastrmski ribnjak „Kraj vodenice“, ukupne proizvodne površine 588 m² se nalazi u širem reonu sela Radanovci, na levoj obali reke Skrapež, na oko 2 km nizvodno od kosjeričkog izvora „Taorska vrela” (Slika 5). Ribnjak se sastoji od 4 nezavisna bazena u kojima se gaji kalifornijska pastrmka (*Oncorhynchus mykiss*). U bazene se voda doprema zatvorenim betonskim kanalom dugim 220 m. Ribnjak maksimalno primi 500 litara vode u sekundi, a ista količina se i ispusti iz

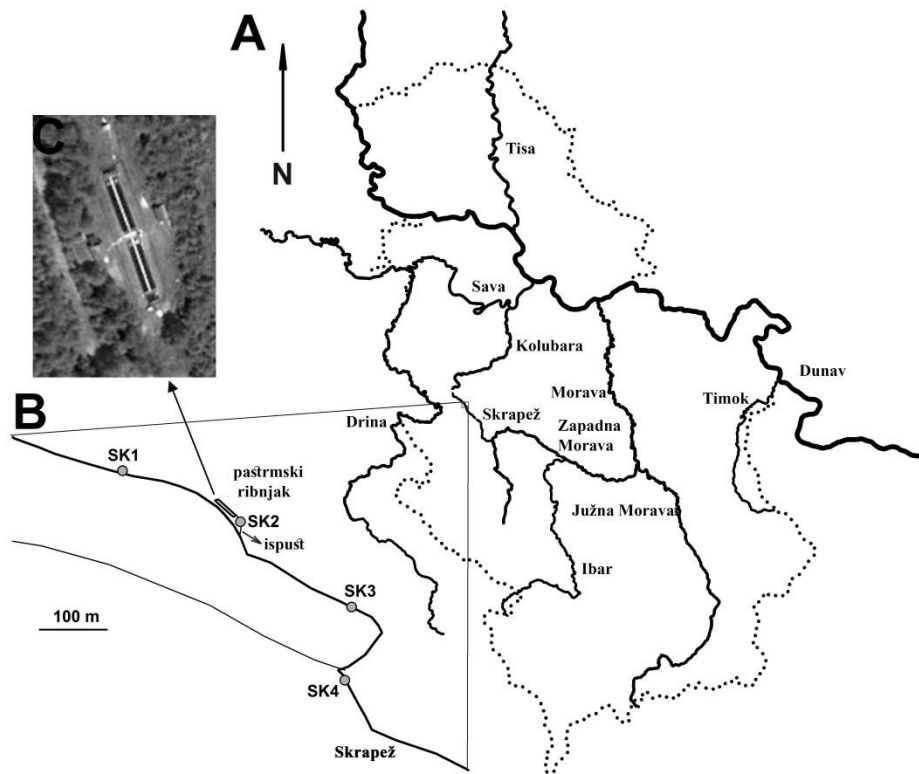
ribnjaka. Voda se sa ribnjaka zajedničkim kanalom ispušta u recipijent, preko taložnika. Riba, se hrani ekstrudiranom hranom (Skreting Optiline he 3p gal, sa niskim sadržajem fosfata 0,9% i sa 42-44% proteina) i gaji se tokom cele godine, a najmanji kapacitet ribnjaka je zabeležen u martu. U prvoj godini našeg istraživanja, proizvodni kapacitet ribnjaka je bio 29 tona.



Slika 5. Pastrmski ribnjak na reci Skrapež, foto M. Božanić

Makrozoobentos za analize je uzorkovan na četiri lokaliteta: jedan iznad, a tri nizvodno od pastrmskog ribnjaka (Slika 6).

Lokalitet SK1 (44°04'00.8"N, 19°50'13.3"E), kontrolni lokalitet, nalazi se na 180 metara uzvodno od ribnjaka, na nadmorskoj visini od 573 m (Slika 7). Prosečna dubina toka tokom perioda istraživanja je 23,08 cm, a širina 4 m. Prosečna temperatura na ovom lokalitetu u mesecima uzorkovanja je 12,1 °C, brzina 0,27 m/s, a prosečan protok 0,35 m³/s. Na obe obale, zastupljena je i zeljasta i šumska vegetacija, a regulacija toka je zemljišna. Oko 70% supstrata čini kamenje koje je veće od 20 cm. Zastupljen je i šljunak, sa udelom od približno 10%, a ostatak supstrata čini sitnije kamenje. Neposredno ispod ovog lokaliteta, za potrebe ribnjaka voda se usmerava betonskim kanalom do samog ribnjaka.



Slika 6. Izgled ribnjaka i pozicija lokaliteta na kojima su obavljena istraživanja u odnosu na njega



Slika 7. Lokalitet SK1, foto M. Božanić

Lokalitet SK2 (44°03'55.9"N, 19°50'21.2"E) smešten je na 566 m nadmorske visine i nalazi se 30 m nizvodno od ribnjaka (Slika 8). Ovaj lokalitet je na samom rečnom kanalu kojim se voda ispušta iz ribnjaka. Prosečna dubina toka tokom istraživanja je 17,25 cm, a širina toka svega 1,39 m. Prosečna temperatura na ovom lokalitetu tokom uzorkovanja je 11,9 °C, brzina 0,55 m/s, a prosečan protok 0,13 m³/s. Na levoj obali ovog lokaliteta je livada, a sa desne strane, na kojoj se nalazi i seoski put, zastupljena je zeljasta vegetacija. Kao supstrat dominira krupnije kamenje obraslo mahovinom (~ 70%). Na ovom lokalitetu prisutne su i velike količine mulja (~ 30%), kao i brojne makrofite, što je i očekivano s obzirom na činjenicu da je voda na ovom lokalitetu, upravo voda koja izlazi direktno iz ribnjaka. Udeo kamenja veličine od 5 do 20 cm, kao i šljunka i peska u supstratu je po 10%. Regulacija toka na ovom lokalitetu je zemljišna.



Slika 8. Lokalitet SK2, foto M. Božanić

Lokalitet SK3 (44°03'47.8"N, 19°50'28.6"E), Slika 9, nalazi se na 552 m nadmorske visine i na 300 m od prethodnog lokaliteta, i to na mestu gde se voda iz ribnjaka uliva u reku i meša se sa njenom vodom. Prosečna dubina toka na ovom mestu je 16,5 cm, a širina 6,7 m. Prosečna temperatura u mesecima uzorkovanja je 11,8 °C, brzina 0,35 m/s, a prosečan protok 0,42 m³/s. Na obalama je zastupljena i drvenasta i zeljasta vegetacija. Što se tiče supstrata, kao i na lokalitetima uzvodno, najviše je zastupljeno

kamenje srednje veličine (ne veće od 20 cm) sa udelom od približno 70%; 5% supstrata čini kamenje veće od 20 cm, a ostatak čine šljunak i pesak. Kao i na prethodna dva lokaliteta, regulacija toka je zemljišna.



Slika 9. Lokalitet SK3, foto M. Božanić

Lokalitet SK4 (44°03'40.9"N, 19°50'28.1"E) nalazi se na 550 m nadmorske visine, nizvodno od trećeg lokaliteta, od kojeg je udaljen oko 300 m (Slika 10). Prosečna dubina toka na SK4 lokalitetu je 21,24 cm, a prosečna širina reke 8,12 m. Prosečna temperatura na ovom lokalitetu u mesecima uzorkovanja je 11,4 °C, brzina 0,34 m/s, a prosečan protok je 0,76 m³/s. Obale su obrasle zeljastom vegetacijom, ali je prisutna i drvenasta vegetacija. Na ovom lokalitetu dominira kamenje srednje veličine, od 5 do 20 cm, koje je obraslo mahovinom i koje je u supstratu zastupljeno sa oko 80%. Ostatak supstrata čini šljunak i pesak. Regulacija toka na ovom lokalitetu je, kao i kod svih lokaliteta koji su nizvodno od ribnjaka, zemljišna.



Slika 10. Lokalitet SK4, foto M. Božanić

3.2. Fizički i hemijski parametri

U toku istraživanja izvršena su merenja fizičkih i hemijskih parametara vode. Na terenu su mereni sledeći fizički parametri: temperatura vode (t_v), širina (l) i dubina (h) rečnog korita, kao i neki hemijski parametri, kao što su koncentracija kiseonika (mg/l), zasićenost vode kiseonikom (%), pH i elektroprovodljivost vode ($\mu\text{S/cm}$). Ostali hemijski parametri su analizirani u Agenciji za zaštitu životne sredine u Beogradu.

3.2.1. Metode za određivanje fizičkih parametara vode

Temperatura vode na terenu merena je MULTI 340i/SET uređajem (WTW, Germany), tako što se sonda spušta ispod površine i zadržava nekoliko minuta, a dobijena vrednost očitava na displeju uređaja.

Širina i dubina rečnog korita mereni su metrom, i to na svim onim mestima na kojima je uočen drugačiji supstrat rečnog dna. Širina toka na sva četiri lokaliteta merena je od leve do desne obale. Takođe, na samom terenu vršeno je i određivanje brzine toka pomoću brzinometra (GEOPACKS Stream Flowmeter, UK). Naime, ovaj uređaj je postavljen na dno rečnog korita, na istim mestima gde je vršeno i merenje dubine njenog

toka i nakon 60 sekundi na displeju je očitavan broj obrtaja. Za brzinu toka (V), korišćena je formula

$$V \text{ (m/s)} = 0.000854C + 0.05$$

gde "C" označava broj obrtaja.

Nadmorska visina, geografska dužina i širina lokaliteta su izmereni pomoću GPS uređaja (Geko 201, Garmin). Protok (Q) je izračunat prema upustvu datom u radu Stojanović (2017). Vizuelnom procenom izvršena je analiza zastupljenosti tipa podloge (videti potpoglavlje 3.1.3.) u skladu sa metodom koja je pruzeta iz literature (Paunović, 2007).

3.2.2. Metode za određivanje hemijskih parametara vode

Pomoću MULTI 340i/SET uređaja, zaranjanjem odgovarajućih sondi ispod površinskog sloja vode, direktno na terenu su izmereni koncentracija kiseonika (mg/l), zasićenost (%), pH i elektroprovodljivost ($\mu\text{S/cm}$). Takođe, na svakom lokalitetu, 30 cm ispod površine vode, u plastične boce zapremine 500 ml, uzimani su uzorci vode za hemijsku analizu. Boce sa vodom su čuvane u prenosnom zamrzivaču i u roku od 24h dopremene su u laboratoriju. Hemijski parametri (Tabela 1) su standardnim metodama analizirani u laboratoriji Agencije za zaštitu životne sredine u Beogradu (<http://www.sepa.gov.rs>).

Tabela 1. Hemijski parametri vode i metode analiza

Parametri	Jedinica	Metoda analize	Parametri	Jedinica	Metoda analize
Alkalitet	mmol/l	SRPS EN ISO 9963-1: 2007	Ukupni azot	mg/l	UP 1.27/PC 12
Ukupna tvrdoća	mg/l	ISO 6059:1984	Ortofosfati	mg/l	UP 1.102/PC 12
Rastvoreni ugljen dioksid	mg/l	UP 1.93/PC 12	Ukupni fosfor	mg/l	APHA AWWA WEF 4500 (A, B, E)
Karbonati	mg/l	SRPS EN ISO 9963-1: 2007	Kalcijum	mg/l	ISO 6058:1984*
Bikarbonati	mg/l	SRPS EN ISO 9963-1: 2007	Magnezijum	mg/l	ISO 6059: 1984*
Ukupni alkalitet	mg/l	SRPS EN ISO 9963-1: 2007	Hloridi	mg/l	SRPS ISO 9297:1997*
pH	mg/l	SRPS H.Z1.111: 1987	Sulfati	mg/l	UP 1.101/PC 12
Ukupne rastvorene soli	mg/l	UP 1.130/PC 12	BPK-5	mg/l	UP 1.4/PC 12*
Amonijum	mg/l	UP 1.96/PC 12	TOC	mg/l	SRPS ISO 8245 : 2007
Nitriti	mg/l	UP 1.97/PC 12	HPK	mg/l	UP 1.100/PC 12
Nitrati	mg/l	UP 1.98/PC 12	Organski azot	mg/l	SRPS ISO 5663: 1998

3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE METALA U SEDIMENTU, VODI I U TELU LARVE *EPHEMERA DANICA*

3.3.1. Analiza sedimenta i vode na prisustvo teških metala

Sa mekane rečne podloge i sa dubine od 0 do 10 cm, za uzorkovanje sedimenta (1000 g) korišćen je Van Veen-ov bagerom zahvatne površine 260 cm², dok su se za čvrstu podlogu rečnog dna zauzimanje sedimenta koristile grabulje i ašov. Za analizu sadržaja teških metala, na 30 cm ispod površine vode, u plastične boce zapremine 500 ml uzimani su uzorci vode i to na sva četiri lokaliteta. Da bi se ovi uzorci konzervisali (pH < 2), u boce sa vodom je dodato 0,5 ml koncentrovane HNO₃ (p.a). Obeležene boce sa uzorcima

sedimenta i vode su transportovane do laboratorije Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu, gde je i vršena analiza na prisustvo teških metala. Izmerena je koncentracija sledećih elemenata: arsen (As), hrom (Cr), kadmijum (Cd), bakar (Cu), gvožđe (Fe), mangan (Mn), nikl (Ni) i olovo (Pb), za šta je korišćena analitička tehnika indukovano kuplovane plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES).

Uzorci sedimenta prvo su homogenizovani i tokom noći na 105°C osušeni do konstantne mase. Suvi sedimenti su potom prosejani kroz laboratorijska sita, a za analizu je uzeta frakcija sa česticama veličine < 500 µm. Na analitičkoj vagi (tačnosti ±0,1 mg), 0,1 g uzorka sedimenta odmereno je direktno u teflonske kivete u koje je, u cilju njegovog rastvaranja, dodato 15 ml carske vode (HNO₃ (65%) + HCl (37%), 1:3 vol/vol). Postupak je obavljen u mikrotalasnom digestoru, na aparatu ETHOS 1 (Advanced Microwave Digestion System, MILESTONE, Italy). Digestija je trajala 20 minuta, pri temperaturi od 220°C i na visokom pritisku koji je iznosio 100 bara, uz prethodno linearno zagrevanje smeše do 220°C, a u trajanju od 10 minuta. Posle hlađenja i bez filtracije, rastvor je kvantitativno prebačen u normalni sud zapremine 25 ml i razblažen sa ultra-čistom vodom električne provodljivosti od 0,05 µS/cm (Barnstead™ GenPure™ Pro, Thermo Scientific, Germany) do fiksne zapremine. Dobijeni rastvor je potom centrifugiran na 3000 obrtaja/minuti, tokom 15 minuta. Koncentracije elemenata u dobijenom rastvoru su izmerene ICP-OES analitičkom tehnikom na instrumentu Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK), koji je opremljen iTEVA operativnim softverom. Standardni rastvori za kalibraciju instrumenta, u adekvatnom/očekivanom koncentracionom opsegu, pripremljeni su od multielementarnih standardnih rastvora: SS-Low Level Elements ICV Stock (10 mg/l) i ILM 05.2 ICS Stock 1 (500 mg/l). Za svaki uzorak, ICP-OES merenje je rađeno u triplikatima. Pouzdanost merenja, odnosno relativna standardna devijacija (RSD) je bila 0,5-3%. Donja granica detekcije (LOD) za sve merene elemente je bila oko 0,1 µg/l.

Na osnovu izmerene koncentracije elemenata u rastvoru, mase uzorka i razblaženja, preračunat je sadržaj elemenata u vodi (mg/l), kao i u suvom sedimentu (mg/kg).

3.3.2. Faktor kontaminacije (CF) sedimenta

Da bi se procenio antropogeni uticaj na kvalitet sedimenta, korišćen je faktor kontaminacije (CF). Faktor kontaminacije je izračunat po sledećoj formuli (Loska i sar., 1997):

$$CF = M_x / M_b$$

gde M_x i M_b predstavljaju koncentracije ispitivanih metala u uzorku i referentnu vrednost koncentracije metala u sedimentu. Kao referentna vrednost korišćena je koncentracija metala u prosečnim kontinentalnim škriljcima (Diaz-de Alba i sar., 2011).

3.3.3. Biota-sediment faktor akumulacije

Da bi se kvantifikovala sposobnost larvi *E. danica* da akumuliraju teške metale iz sedimenta, korišćen je faktor akumulacije biota-sediment (BSAF, Mackay i Fraser, 2000). BSAF je izračunat po sledećoj formuli:

$$BSAF = M_E / M_S$$

gde M_E označava koncentraciju metala u larvama *E. danica*, a M_S njegovu koncentraciju u sedimentu.

3.3.4. Određivanje sadržaja teških metala u telu *Ephemera danica*

Prikupljanje larvi *E. danica* za potrebe određivanja koncentracije teških metala u njihovom telu, obavljeno je sezonski (april, jul i oktobar 2015. godine i januar 2016. godine) u reci Skrapež, u isto vreme kada je vršeno uzorkovanje makrozoobentosa. Na sva četiri lokaliteta, kvalitativnom metodom pomoću kuhinjskog sita i pincete, sakupljeno je po 20-25 jedinki *E. danica* koje su na terenu fiksirane 96% alkoholom u staklenim bočicama. Uzorci su transportovani do hemijske laboratorije Agencije za zaštitu životne sredine u kojoj je izvršena analiza jedinki na prisustvo teških metala: arsen (As), kadmijum (Cd), hrom (Cr), bakar (Cu), gvožđe (Fe), olovo (Pb), nikl (Ni) i mangan (Mn), po standardnoj metodi US EPA Method 200.3.

Uzorci larvi su homogenizovani, a zatim je 5 g zamrznutog uzorka tkiva prebačeno u sud od 125 ml, u koji je dodato 10 ml koncentrovane azotne kiseline i uz lagano mešanje je vršeno njegovo zagrevanje dok se tkivo nije rastvorilo. Temperatura se postepeno povećavala do ključanja, sve dok rastvor nije postao braon boje. Zatim se uzorak hladio i u njega je dodavano dodatnih 5 ml koncentrovane azotne kiseline, nakon čega se uzorak ponovo zagrevao, dok rastvor ne bi povratio smeđu boju. Pristupalo se ponovnom hlađenju, pa se u uzorak dodavalo 2 ml koncentrovane azotne kiseline, ponovo se zagrevao, nakon čega bi mu se zapremina svela na 5-10 ml. U sledećem koraku, u ohlađen uzorak se dodavalo 2 ml 30% hidrogen peroksida, vraćao se na zagrevanje i smanjila mu se zapremina na 5-10 ml. Nakon toga se uzorak ponovo hladio, dodavalo mu se 2 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline, zagrevao se i zapremina mu se smanjila na 5 ml. Ovako pripremljen i ohlađen uzorak se prenosio u sud zapremine od 100 ml, razblažio sa ASTM tip I vodom, promešao i ostavio da se rastvori. Sadržaj teških metala u ovim uzorcima se analizirao pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), na uređaju Perkin Elmer AAnalyst 600.

3.4. ODREĐIVANJE SPECIFIČNE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA SOD I GPX I KOLIČINE UKUPNOG GLUTATIONA, GSH

Da bi analizirali uticaj ispusnih voda pastrmskog ribnjaka na sistem antioksidativne zaštite *E. danica*, larve ove vrste se prikupljene na četiri lokaliteta i to u isto vreme kada su uzimani i ostali uzorci. Na svakom lokalitetu prikupljeno je po 20-25 larvi koje su na terenu odlagane u kriokontejner sa tečnim azotom i transportovane do laboratorije Odeljenja za biohemiju i fiziologiju insekata Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”. Tako dopremljene jedinke su izmerene na vagi preciznosti 0.0001 g (AE 163; Mettler-Toledo International) i do momenta pripreme homogenata, čuvane su na -80 °C.

Za određivanje i analizu komponenti sistema antioksidativne zaštite korišćeni su homogenati celih larvi. Larve su homogenizovane na ledu u saharoznom puferu pH 7,4 (0,25 M saharoza, 0,05 M TRIS, 0,10 M EDTA; Serva, Heidelberg, Germany), tako da koncentracija tkiva bude 100 mg/ml. Homogenizacija je trajala 3 ciklusa po 10 s, sa

pauzama od 15 s na 2000 rpm. Dobijeni homogenati su sonifikovani (3 x 10 sekundi sa pauzama od 10 sekundi i na frekvenciji od 20 kHz; sonifikator model HD2070, Bandelin, Berlin, Germany) i potom centrifugirani u trajanju od 100 minuta na 37000g i temperaturi od 4 °C (Beckman L7-55 Ultracentrifuge). Za određivanje ukupnog glutationa, GSH, deo sonifikovanih homogenata je 10 minuta centrifugiran na 5000 rpm (centrifuga model 5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany) i to nakon dodatka 5% sulfosalicilne kiseline (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), koja se koristi da bi se istaložili proteini. Nakon centrifugiranja, izdvojeni su supernatanti koji su zamrznuti na -80 °C.

Na svim lokalitetima prikupljeno je i po nekoliko larvi koje su fiksirane u 96% etanolu radi identifikacije koja je izvršena na Zeiss Discovery V8 stereomikroskopu (Carl ZEISS GmbH, Austrija) i uz korišćenje ključeva za determinaciju (Nilsson, 1996; Bauernfeind i Soldán, 2012) u laboratoriji Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta u Beogradu.

3.4.1. Određivanje koncentracije proteina

Ukupna koncentracija proteina u uzorcima određivana je po Bradfordovoj metodi (Bradford, 1976), pri čemu je kao standard korišćen goveđi serum albumin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).

3.4.2. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD)

Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) izvršena je u skladu sa procedurom Misra and Fridovich (1972). Superoksid dismutaza ima sposobnost da inhibira autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u sredini koja je bazna. Pri ovoj konverziji, oslobađa se superoksid anjon radikal (O_2^-) koji ubrzava reakciju autooksidacije adrenalina. Metod se zasniva na sposobnosti SOD da iz uzorka uklanja O_2^- , onemogućavajući autooksidaciju adrenalina, koja je zavisna od ovog anjona. Spektrofotometrijski se meri brzina autooksidacije adrenalina preko promene svetlosne apsorpcije, tj. prati se promena apsorbanca u vremenu, na talasnoj dužini od 480 nm i na temperaturi 25 °C u reakcionoj

smeši koja se sastoji od uzorka, adrenalina i karbonatnog pufera pH 10,2 (50 mM Na₂CO₃ i 0,1 mM EDTA). Jedinica kojom se izražava aktivnost SOD se definiše kao količina enzima koja je dovoljna da dovede do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti i izražava se kao U/mg proteina.

3.4.3. Određivanje aktivnosti enzima glutacion peroksidaze (GPx)

Za određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze koristila se kuplovana enzimaska metoda (Tamura i sar., 1982), koja se zasniva na spregnutoj aktivnosti glutacion peroksidaze, GPx i glutacion reduktaze, GR. Naime, GPx katalizuje oksidaciju redukovanog u oksidovani glutacion, uz redukciju organskih peroksida, a potom GR katalizuje redukciju oksidovane u redukovanu formu glutaciona, uz oksidaciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, NADPH. Aktivnost GPx se detektuje spektrofotometrijski na 340 nm. Jedinica za aktivnost ovog enzima se definiše kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u jednoj minuti (nmol NADPH/min), dok se njegova aktivnost u tkivima izražava kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u jednoj minuti po miligramu proteina (nmol NADPH/min/mg proteina).

3.4.4. Određivanje količine ukupnog glutaciona (GSH)

U homogenatima u kojima su proteini istaloženi sulfo-salicilnom kiselinom, određivana je količina ukupnog glutaciona (Griffith, 1980). Ova metoda se zasniva na cikličnom procesu oksidacije redukovanog glutaciona sa 5,5 ditio-bis-2 nitrobenzoičnom kiselinom (DTNB), pri čemu nastaje oksidovani glutacion i 2-nitro-5-tiobenzoična kiselina (TNB), a potom uz pomoć enzima glutacion reduktaze dolazi do redukcije oksidovane u redukovanu formu glutaciona, uz istovremenu oksidaciju koenzima NADPH. Ukupni glutacion je proporcionalan količini formiranog TNB, čija se brzina formiranja prati spektrofotometrijski, merenjem svetlosne apsorbcije na 412 nm. Ukupni glutacion se preračunava u odnosu na standard i izražava se u nmol/g tkiva.

Za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD i GPx), kao i za određivanje ukupnog glutationa (GSH) korišćeno je 10 homogenata (uzoraka). Svi pomenuti biomarkeri simultano su mereni tri puta, na Shimadzu UV - 160 spektrofotometru (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

3.5. ANALIZA ZAJEDNICA MAKROZOOBENTOSA

3.5.1. Prikupljanje i identifikacije uzoraka makrozoobentosa

Biološke analize su obavljene na uzorcima koji su sakupljeni na terenu i potom determinisani u laboratoriji Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta u Beogradu. Za sakupljanje uzoraka, korišćena je modifikovana Surberova mreža (Slika 11) zahvatne površine od 300 cm² i sa okcima promera 250 µm.



Slika 11. Surberova mreža, foto M. Božanić

Na svim lokalitetim i pri svakom izlasku na teren, uzeta su po tri poduzorka i to duž transekta od leve do desne obale. Prilikom uzorkovanja, horizontalni preklopni ram je stavljen na dno rečnog korita, nasuprot vodenom toku, kako bi se organizmi makrozoobentosa spirali u mrežu (Slika 12). Mreža se nakon pet minuta vadi iz vode i detaljno ispira, čime svi organizmi dospevaju u kolektorsku mrežicu koja se nalazi na kraju Surberove mreže.



Slika 12. Sakupljanje uzoraka Surberovom mrežom,
foto Lj. Žunić

Sadržaj kolektorske mrežice je odložen u plastične boce, a uzorak fiksiran 96% alkoholom. Na ovaj način pripremljen uzorak, dopremljen je do laboratorije gde su su organizmi makrozoobentosa odvajali od detritusa, šljunka i mulja (Slika 13), nakon čega se pristupilo njihovoj identifikaciji do nivoa vrste, roda ili familije.



Slika 13. Razdvajanje uzoraka u laboratoriji, foto M. Božanić

U laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu, Biološkog fakulteta izvršena je deteminacija svih organizama zoobentosa, osim familije Simuliidae (Odeljenje za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu) i reda Coleoptera (Laboratorija Agencije za zaštitu životne sredine u Beogradu). Identifikovan materijal se čuva na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u Institutu za zoologiju, na Katedri za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju. Za determinaciju organizama korišćena je adekvatna literatura (Rozkošny, 1980; Edington i Hildrew, 1981; Pillot, 1984 a, b; Nilsson, 1996; Waringer i Graf, 1997; Glöer i Meier-Brook, 1998; Soldán i Landa, 1999; Jacob, 2003; Zwick, 2004; Lechthaler i Stockinger, 2005; Pillot, 2009; Bauernfeind i Soldán, 2012) i ZEISS Discovery V8 i BRESSER Science ETD-101 stereomikroskop.

3.5.2. Primena različitih indeksa u analizi zajednica makroinvertebrata

Ekološke analize su obuhvatile više indeksa koji na najbolji način oslikavaju reakciju organizama makrozoobentosa reke Skrapež na antropogeni uticaj, u našem slučaju na uticaj pastrmskog ribnjaka (Stojanović, 2017).

Za izračunavanje ovih indeksa, korišćen je program Asterics 4.04, koji se koristi za određivanje bioloških indeksa i pratećih parametara kvaliteta vode na osnovu zajednica makroinvertebrata. Upotreba ovog programa podrazumeva izradu Excel tabele sa podacima o broju pronađenih vrsta po metru kvadratnom na svakom lokalitetu i u svakoj sezoni uzorkovanja. Zatim se za svaki uneti takson pronađe odgovarajuća šifra (ID_ART), pa se tako sređena Excel tabela unosi u Asterix program koji izračunava biotičke indekse, indekse diverziteta i indekse saprobnosti, kao i tipove indeksa koji su bazirani na strukturnim i funkcionalnim atributima zajednice makroinvertebrata. Ovaj program izračunava pomenute indekse na osnovu baze podataka za sve Evropske zemlje, a koja obuhvata 10 000 vrsta.

Diverzitet zajednica se može izračunati u celosti, za šta se koristi Šenon-Winerov indeks, H (Shannon i Wiener, 1949) ili se mogu analizirati posebno dve njegove komponente: kvalitativna procena bogatstva vrsta (S) koja podrazumeva ukupan broj vrsta u uzorku i ujednačenost broja jedinki po vrstama tj. kvantitativna komponenta koja se izražava preko Simpsonovog indeksa diverziteta (Simpson, 1949). Za izračunavanje Šenonovog indeksa, pored ukupnog broja vrsta u zajednici, važna je i distribucija jedinki po vrstama. Vrednost ovog indeksa je u opsegu od 0 do H_{\max} (prirodni logaritam ukupnog broja vrsta u zajednici, Krpo-Ćetković i sar., 2014). Simpsonov indeks diverziteta na osnovu dve nasumično odabrane jedinke u okviru zajednice, opisuje kolika je verovatnoća da one pripadaju različitim vrstama (njegova vrednost se kreće od 0 do 1).

Od biotičkih indeksa, u analizi podataka su korišćeni BMWP i ASPT indeks. BMWP indeks (Chesters, 1980) zahteva identifikaciju samo da nivoa familije, pri čemu se svakoj familiji iz uzorka dodeljuje unapred definisana vrednost (skor). Ovi skorovi imaju vrednost od 1 do 10 i predstavljaju toleranciju određenih familija prema zagađenju. Visoke vrednosti skora imaju familije koje su osetljive na zagađenje (netolerantne su i prve nestaju iz rečnog toka), dok familije tolerantne na organsko zagađenje imaju niske vrednosti (skor 1 ili 2). Sabiranjem vrednosti za svaku familiju u uzorku dobija se vrednost ovog indeksa, sa definisanim opsegom koji ukazuju na određeni kvalitet vode (Tabela 2). Što je vrednost BMWP indeksa veća, to je voda boljeg kvaliteta. Iz BMWP indeksa je izveden ASPT indeks, koji se dobija kada se dobijena vrednost BMWP indeksa podeli sa ukupnim brojem

familija u analiziranom uzorku. Vrednosti ASPT indeksa i kriterijum za određivanje kvaliteta vode date su u Tabeli 2.

Tabela 2. Kvalitet vode zasnovan na vrednostima indeksa BMWP i ASPT

BMWP vrednost indeksa	Kvalitet vode na osnovu BMWP indeksa	ASPT vrednost indeksa	Kvalitet vode na osnovu ASPT indeksa
0-10	Veoma zagađena	>6	Čista voda
11-40	Zagađena	5-6	Sumnjiv kvalitet
41-70	Izmenjena	4-5	Umereno zagađenje
71-100	Dobra	<4	Ozbiljno zagađenje
>100	Veoma dobra		

Kvalitet vode određivan je primenom indeksa saprobnosti prema Zelinki i Marvanu (Zelinka i Marvan, 1961) i to na nivou čitave zajednice. Na osnovu ovog indeksa moguće je odrediti klasu kvaliteta vode, kao i saprobiološke zone (od ksenosaprobne do polisaprobne vode). Vrednost ovog indeksa raste kako se pogoršava kvalitet vode. Na osnovu rezultata ovog indeksa izvršena je procena ekološkog statusa istraživane reke u skladu sa Pravilnikom o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (Službeni glasnik RS 74/2011).

Trofički indeksi, odnosno funkcionalne trofičke gilde, su predstavljene procentom sekača, strugača, ukupnih sakupljača i to aktivnih, pasivnih i sakupljača žeteoca (Cummins, 1988), kao i predatora (Kerans i Karr, 1994) u ukupnom uzorku.

3.6. STATISTIČKE ANALIZE PODATAKA

Svi dobijeni rezultati izraženi su kao srednja vrednost \pm standardna greška. Da bi se uzela u obzir i prostorna i vremenska varijabilnost podataka, aktivnosti SOD i GPx i

količina ukupnog glutationa, GSH, su statistički poređeni pomoću dvofaktorske analize varijanse (two-way ANOVA). Poređenje abiotičkih parametara vode vršeno je u odnosu na kontrolni lokalitet (SK1) da bi se utvrdio uticaj ribnjaka, kao i u odnosu na lokalitet neposredno nizvodno od ribnjaka (SK2) kako bi se utvrdio oporavak zajednice faune dna od uticaja ribnjaka, za šta smo koristili jednofaktorsku analizu varijanse (ANOVA). Parna poređenja su u oba slučaja vršena pomoću Holm-Sidak testa. ANOVA je korišćena i za poređenje koncentracija metala u sedimentu, vodi i larvama *E. danica*, kao i za poređenje BSAF vrednosti. U ovom slučaju je za parno poređenje korišćen Fišerov test najmanje značajne razlike (LSD test). Za poređenje koncentracija metala u sedimentu i larvama *E. danica* na istom lokalitetu je korišćen je Studentov t-test. Korelacija između parova uzoraka je kvantifikovana pomoću Pirsonovog koeficijenta korelacije. Rezultati su smatrani statistički značajnim ako je $P < 0,05$. Svi testovi su urađeni u Sigma Plot 12 softveru (Systat Software Inc., USA).

Da bi se utvrdio uticaj abiotičkih faktora vode na aktivnost SOD i GPx i ukupni glutation, GSH, kao i da bi se procenio uticaj koncentracije metala u sedimentu na koncentraciju metala u larvama *E. danica* i odgovarajuće BSAF vrednosti korišćena je analiza koinercije, CIA (Dolédec i Chessel, 1994). Ova analiza omogućava istovremenu ordinaciju dve matrice podataka koje imaju isti broj redova. Ose koinercije su izračunate tako što su maksimizirani faktorski rezultati dobijeni nezavisnim analizama dve ulazne tabele pomoću analize glavnih komponenti (PCA) korelacione matrice. Ovako dobijeni rezultati su analogni rezultatima koje bi dala analiza redundance (RDA), ali je CIA izabrana zbog svoje jedinstvene osobine da jasno ilustruje jačinu zajedničke strukture između biotičkih i abiotičkih parametara za svaki lokalitet, a koja je obratno proporcionalna dužini strelice koja povezuje njihove standardizovane rezultate. Monte-Carlo permutacioni test korišćen je za proveru značajnosti zajedničke strukture između dva skupa podataka koji su dobijeni pomoću CIA analize. CIA analiza je vršena pomoću ADE-4 softvera (Thioulouse i sar., 1997).

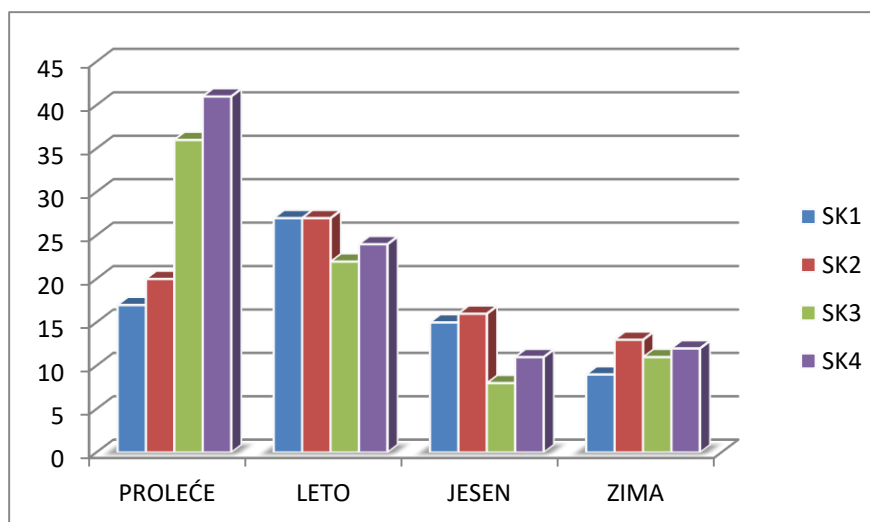
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. REZULTATI BIOLOŠKIH ANALIZA

4.1.1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež

U reci Skrapež, na četiri lokaliteta (SK1, SK2, SK3 i SK4) i tokom četiri sezone u kojima je vršeno istraživanje, identifikovano je ukupno 82 taksona: 34 je identifikovano do nivoa vrste, 3 do nivoa grupe vrsta, 33 taksona su identifikovana do nivoa roda, 8 taksona do nivoa familije, 3 taksona do nivoa podfamilije i jedna određena klasa (Prilog). Najveći udeo unutar zajednica makrozoobentosa imaju larve iz različitih redova insekata. Najraznovrsnija grupa među njima je red Diptera sa ukupno 23 taksona, a zatim slede redovi Ephemeroptera sa 18 taksona i Trichoptera sa 17 taksona. Iz reda Coleoptera identifikovano je 10 taksona. Red Plecoptera zastupljen je samo sa 2 taksona, dok redovi Odonata i Megaloptera imaju po 1 identifikovan takson. Od ostalih grupa, najviše identifikovanih taksona je među Mollusca (5); sledi subfilum Crustacea sa 3 identifikovana taksona i Annelidae i Platyhelminthes sa po 1 identifikovanim taksonom (Prilog).

Kvalitativnom analizom makrozoobentosa na lokalitetu SK1 potvrđeno je prisustvo 45 taksona, na lokalitetu SK2 njih 52, a na lokalitetima SK3 i SK4 je prisutno 53, tj. 57 taksona, respektivno (Prilog). Sezonski, najveći broj taksona (41) zabeležen je u proleće na lokalitetu SK4, dok je samo 8 taksona bilo prisutno u jesen, na lokalitetu SK3 (Grafik 1).



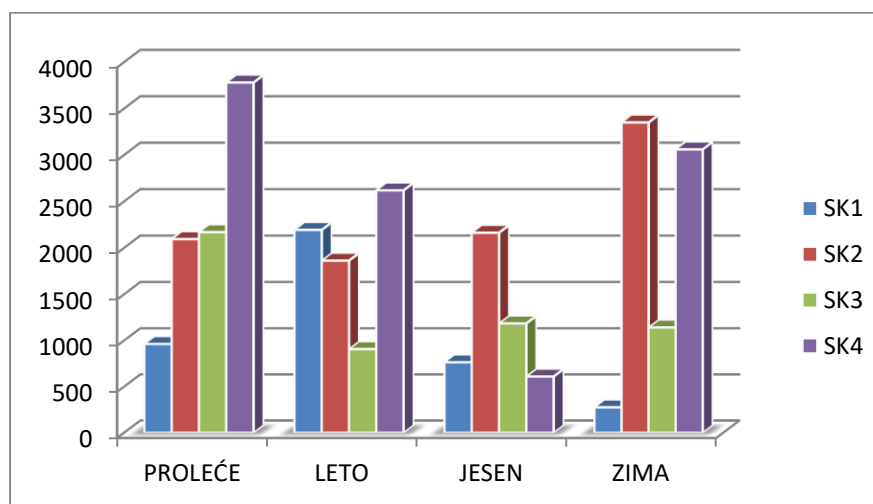
Grafik 1. Sezonska promena brojnosti taksona u reci Skrapež, na četiri lokaliteta: SK1, SK2, SK3 i SK4

Najveći broj taksona u reci Skrapež je iz klase Insecta. Među predstavnicima reda Diptera, koji je najraznovrsniji, četiri taksona su zabeležena samo na jednom lokalitetu: *Blepharicera fasciata* (Westwood, 1842) na lokalitetu SK4, *Limnophila* sp. i *Odontomya* sp. na SK2, a *Psychoda* sp. na lokalitetu SK3. Ostali taksoni su prisutni na više lokaliteta. Najzastupljeniji su predstavnici familije Chironomidae koji su u svim sezonama registrovani na tri ili četiri lokaliteta. Na svim lokalitetima su nađeni i *Atherix ibis* (Fabricus, 1798), *Hexatoma bicolor* (Meigen, 1818), *Tabanus* sp., *Simulium* sp., *Simulium ornatum* gr., *Ablabesmya* sp., kao i neki predstavnici iz podfamilije Tanypodinae. Red Ephemeroptera zastupljen je sa 18 taksona, od kojih je 8 determinisano do nivoa vrste, 1 do nivoa grupe vrsta, 6 taksona je determinisano do nivoa roda i 3 do nivoa familije. Na svim lokalitetima i u svim sezonama su zabeležene vrste *Ephemera danica* (Müller, 1764), *Ecdyonurus venosus* (Fabricius, 1775) i *Epeorus assimilis*, dok su ostali taksoni prisutni samo u određenoj sezoni i to ili na jednom lokalitetu (*Rhitrogena germanica* (Eaton, 1885), *Ephemerella* sp., *Baetis* sp., *Epeorus* sp., Ephemerellidae, Leptophlebiidae), ili na dva ili tri lokaliteta. Iz reda Trichoptera koji je na reci Skrapež zastupljen sa 17 taksona, na sva četiri lokaliteta zabeleženo je prisustvo samo jedne vrste – *Sericostoma personatum* (Kolenati, 1848) i jednog roda – *Rhyacophila* sp. Taksoni *Potamophylax* sp., *Hydropsyche contubernalis* (McLachlan, 1865) i *Rhyacophila cf. fasciata* su nađeni u proleće na jednom lokalitetu. Ostali taksoni iz ovog reda su zastupljeni na dva ili tri lokaliteta. Iz reda Coleoptera skoro svi identifikovani taksoni su prisutni na sva četiri lokaliteta. Izuzetak su taksoni *Ochthebius* sp., *Hydraena* sp. Lv., kao i vrsta *Pomatinus substriatus* (Muller, 1806) čije prisustvo je zabeleženo samo na po jednom lokalitetu. Na dva lokaliteta su bili prisutni taksoni *Oulimnius* sp. i *Hydrophilidae* sp., dok je na tri lokaliteta pronađen takson *Elmis* sp. U reci Skrapež, najmanje su zastupljeni taksoni iz redova Plecoptera, Odonata i Megaloptera. U okviru reda Plecoptera, zabeležena su dva taksona – *Perla marginata* (Panzer, 1799) koja je u leto i jesen nađena samo na lokalitetu SK2 i *Capnia* sp. sa lokaliteta SK2 i SK3. Vrsta *Cordulegaster annulatus* (Latreille, 1804) iz reda Odonata je zabeležena na lokalitetima SK3 i SK4, dok je vrsta *Sialis fuliginosa* (Pictet, 1836) iz reda Megaloptera nađena u jesen i to na lokalitetu SK1.

Na reci Skrapež, zabeleženo je i pet taksona iz filuma Mollusca. Na sva četiri lokaliteta nađena je vrsta *Radix peregra* (Müller, 1774), dok su taksoni *Myxas glutinosa* (Müller, 1774) i *Planorbarius* sp. zabeleženi na po jednom lokalitetu. Iz reda Amphipoda, svi taksoni su prisutni na po tri lokaliteta. U okviru filuma Platyhelminthes identifikovana je samo vrsta *Dugesia lugubris* (Schmidt, 1861), čije je prisustvo zabeleženo na sva četiri lokaliteta. Na svim lokalitetima zabeležene su i jedinke iz klase Oligochaeta (filum Annelida).

4.1.2. Kvantitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež

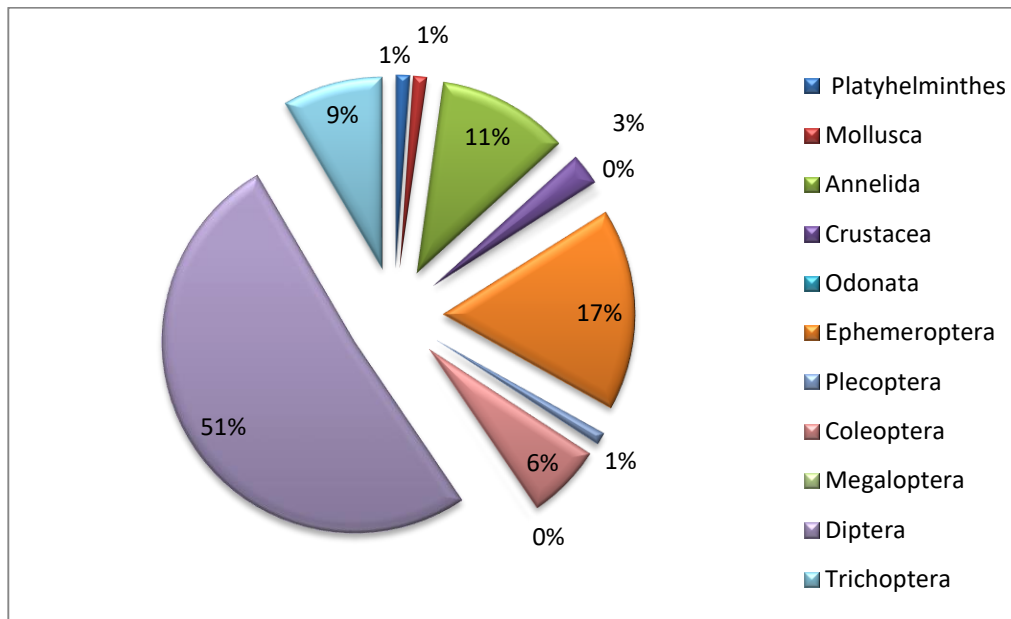
Kvantitativnom analizom zajednica makrozoobentosa u reci Skrapež na četiri lokaliteta (SK1, SK2, SK3 i SK4) i kroz sve sezone (proleće, leto, jesen i zimu), procenjeno je da je prosečna brojnost jedinki 7.287 ind/m². Najviše jedinki (Grafik 2) je nađeno na lokalitetu SK4 u toku proleća (3.781 ind/m²), a najmanji broj jedinki je zabeležen u zimu na lokalitetu SK1 (276 ind/m²).



Grafik 2. Sezonska promena brojnosti taksona zajednice makrozoobentosa u reci Skrapež, na četiri lokaliteta: SK1, SK2, SK3 i SK4

U reci Skrapež, u okviru klase Insecta, procentualno su najdominantnije jedinke iz reda Diptera (51,05%). Sledi red Ephemeroptera sa 17,01%, Annelida sa 11,05%,

Trichoptera sa 8,42% i Coleoptera sa 6,34%. Zastupljenost ostalih redova je manja od 5%, a najmanje su zastupljeni redovi Odonata sa 0,15% i red Megaloptera sa udelom od svega 0,03% (Grafik 3).

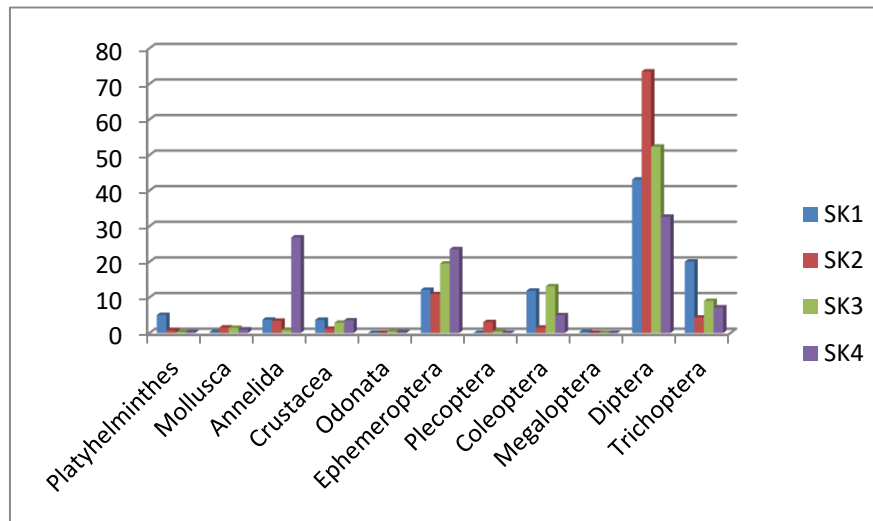


Grafik 3. Relativna brojnost (%) taksonomskih grupa u odnosu na ukupnu brojnost jedinki (ind/m²) u reci Skrapež

Posmatrajući relativnu brojnost pojedinih taksona po lokalitetima, uočava se da je na svim lokalitetima najbrojniji red Diptera, koji svoju najveću brojnost dostiže na SK2 lokalitetu (73,46% u odnosu na sve taksonomske grupe). Slede redovi Ephemeroptera čija je brojnost najveća na SK4 lokalitetu i iznosi 23,5% i red Trichoptera koji najveću brojnost dostiže na SK1 lokalitetu i iznosi 20,03%. Red Plecoptera je najbrojniji na SK2 lokalitetu i iznosi 3,04% i čini najmanje brojna takson što se tiče EPT zajednice (Grafik 4).

Kroz sve sezone, najbrojniji je red Diptera, koji svoj maksimum dostižu u proleće (4380 ind/m²). U ovoj sezoni, najmanje brojni su redovi Odonata (11 ind/m²) i Annelida (11 ind/m²), a iz reda Megaloptera nije zabeležena ni jedna jedinka. U leto su najmanje zastupljene Mollusca (44 ind/m²), a nisu pronađene jedinke iz redova Megaloptera, Odonata, Annelida i Platyhelminthes. U jesenjoj sezoni, zabeleženo je prisustvo svih

taksona, pri čemu je najbrojniji red Diptera (2697 ind/m²), a najmanje brojni su redovi Odonata (11 ind/m²) i Megaloptera (11 ind/m²). Što se tiče zime, kao i u prethodnim sezonama, najbrojniji je red Diptera (3983 ind/m²), a najmanje je bilo predstavnika Odonata (22 ind/m²), dok nije bilo jedinki iz redova Plecoptera i Megaloptera (Tabela 3).



Grafik 4. Relativna brojnost (%) taksonomskih grupa u reci Skrapež, na četiri lokaliteta (SK1, SK2, SK3 i SK4)

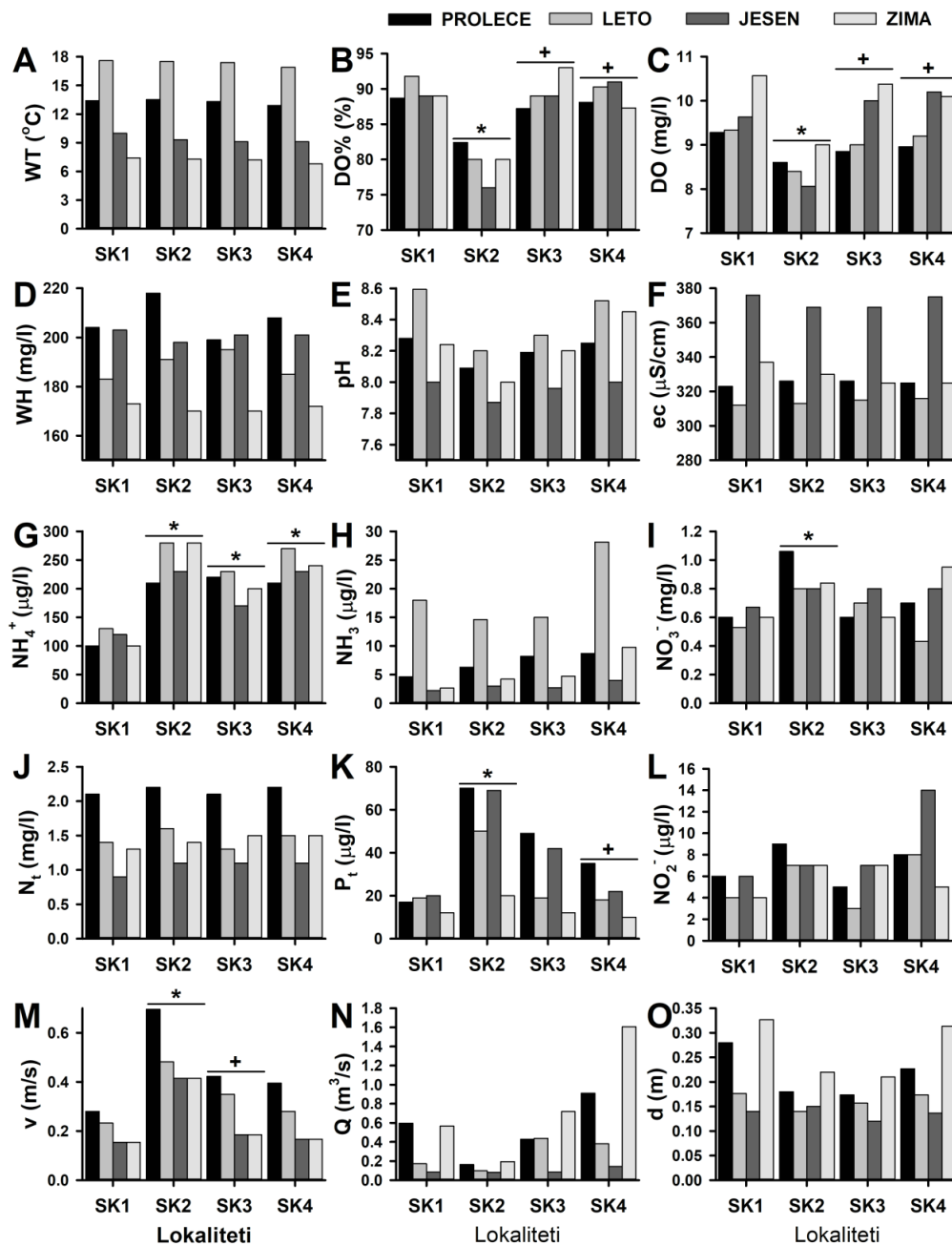
Tabela 3. Brojnost taksonomskih grupa po sezonama ind/m²

	Proleće	Leto	Jesen	Zima
Platyhelminthes	22	0	244	44
Mollusca	66	44	122	99
Annelida	11	0	500	2708
Crustacea	400	178	155	44
Odonata	11	0	11	22
Ephemeroptera	2318	1831	310	510
Plecoptera	22	244	44	0
Coleoptera	719	841	88	199
Megaloptera	0	0	11	0
Diptera	4380	3815	2697	3983
Trichoptera	1060	632	542	221

4.2. UTICAJ RIBNJAKA NA FIZIČKE I HEMIJSKE PARAMETARE VODE REKE SKRAPEŽ

U odnosu na kontrolni SK1 lokalitet, na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka (SK2), dolazi do statistički značajnog smanjenja koncentracije kiseonika (Slika 14 C) i zasićenja kiseonikom (Slika 14 B), uz istovremeno statistički značajno povećavanje koncentracije amonijum jona, nitrata i ukupnog fosfora, kao i brzine toka (Slika 14, G, I, K, M). Ako se analizira oporavak ovih vrednosti na lokalitetima nizvodno od SK2 može se uočiti da već na SK3 dolazi do statistički značajnog oporavka kako koncentracije, tako i zasićenja kiseonikom (Slika 14 B i C), kao i brzine toka (Slika 14 M), dok na SK4 dolazi do statistički značajnog oporavka koncentracije ukupnog fosfora (P_t) (Slika 14 K). Koncentracija NH_4^+ ostaje statistički značajno povećana na svim lokalitetima nizvodno od ribnjaka (Slika 14 G). Parametri koje nisu karakterisale statistički značajne promene kako u odnosu na kontrolni, tako ni u odnosu na SK2 su: temperatura (slika 14A), tvrdoća vode (slika 14D), pH (slika 14E), elektroprovodljivost (slika 14F), amonijak (slika 14H), ukupni azot (slika 14J), nitriti (slika 14L), protok (slika 14N) i dubina (slika 14O).

U odnosu na sezonsko variranje izmerenih abiotičkih faktora pored očekivanih i statistički značajnih promena t_w posebno treba istaći da u zimu DO dostiže statistički značajan maksimum, a WH i P_t statistički značajne minimume, dok u jesen pH i N_t dostižu statistički značajne minimume. Prema očekivanju svi hidrološki parametri dostižu statistički značajne maksimume u proleće, a protok i dubina i u zimu (Tabela 4).



Slika 14. Fizički i hemijski parametri vode reke Skrapež mereni na četiri lokaliteta (SK1, SK2, SK3 i SK4) i u četiri sezone (proleće, leto, jesen i zima). *predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni (SK1) lokalitet ($P < 0,05$); + predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na SK2 lokalitet ($P < 0,05$) (za skraćenice, videti poglavlje Materijal i metode).

Tabela 4. Srednje vrednosti hemijskih i hidrodinamičkih parametara u sezonama istraživanja u reci Skrapež.

	Proleće	Leto	Jesen	Zima	P	F
t_w (°C)	13.3±0.1 ^a	17.4±0.2 ^b	9.4±0.2 ^c	7.2±0.1 ^d	<0.001	2576
DO%	87±1 ^a	88±3 ^a	86±3 ^a	87±3 ^a	0.79	0.35
DO (mg/l)	8.79±0.12 ^a	8.98±0.21 ^a	9.52±0.51 ^{a,c}	10.10±0.39 ^c	0.012	6.51
WH (mg/l)	207±4 ^a	188±3 ^b	201±1 ^a	171±1 ^d	<0.001	32.7
pH	8.20±0.04 ^a	8.41±0.10 ^b	7.96±0.03 ^c	8.22±0.09 ^a	<0.001	18.84
ec (µS/cm)	325±1 ^a	314±1 ^b	372±2 ^c	329±3 ^a	<0.001	178
NH₄⁺ (µg/l)	185±28 ^a	225±33 ^a	188±27 ^a	205±39 ^a	0.072	3.29
NO₂⁻ (µg/l)	7.0±0.9 ^a	5.5±1.2 ^a	8.5±1.8 ^a	5.8±0.8 ^a	0.219	1.79
NO₃⁻ (µg/l)	750±120 ^a	600±90 ^a	780±20 ^a	750±100 ^a	0.428	1.02
N_t (mg/l)	2.15±0.03 ^a	1.45±0.06 ^b	1.05±0.05 ^c	1.42±0.05 ^b	<0.001	136
PO₄³⁻ (µg/l)	18±5 ^a	18±2 ^a	15±3 ^a	10±0 ^a	0.152	2.25
P_t (µg/g)	43±11 ^a	26±8 ^{a,b}	38±11 ^{a,b,c}	14±2 ^b	0.010	6.90
v (m/s)	0.45±0.09 ^a	0.34±0.05 ^b	0.23±0.06 ^c	0.23±0.06 ^c	<0.001	18.36
Q (m³/s)	0.52±0.15 ^a	0.27±0.08 ^a	0.10±0.02 ^{a,c}	0.77±0.30 ^{a,b}	0.028	4.85
d (cm)	21.5±2.5 ^a	16.2±0.8 ^{a,b}	13.7±0.6 ^{b,c}	26.8±3.0 ^a	<0.001	15.6

a, b, c, d Uzorci iz različitih sezona su statistički značajno različiti ukoliko su obeleženi različitim slovom.

4.3. UTICAJ PASTRMSKOG RIBNJAKA NA SISTEM ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE LARVE *Ephemera danica*

Aktivnost SOD je najviša u proleće, i to na kontrolnom lokalitetu, dok nizvodno dolazi do njenog pada i to tokom svih sezona (Tabela 5). U leto je aktivnost ovog enzima ujednačena na svim lokalitetima, dok u jesen i zimu pokazuje isti trend promena: u odnosu na kontrolni lokalitet, aktivnost SOD je u porastu na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka. Nizvodno, na lokalitetima SK3 i SK4 aktivnost ovog enzima opada, i na lokalitetu SK4 je u jesen manja, a u zimu neznatno viša od vrednosti izmerenih na SK1. Aktivnost enzima

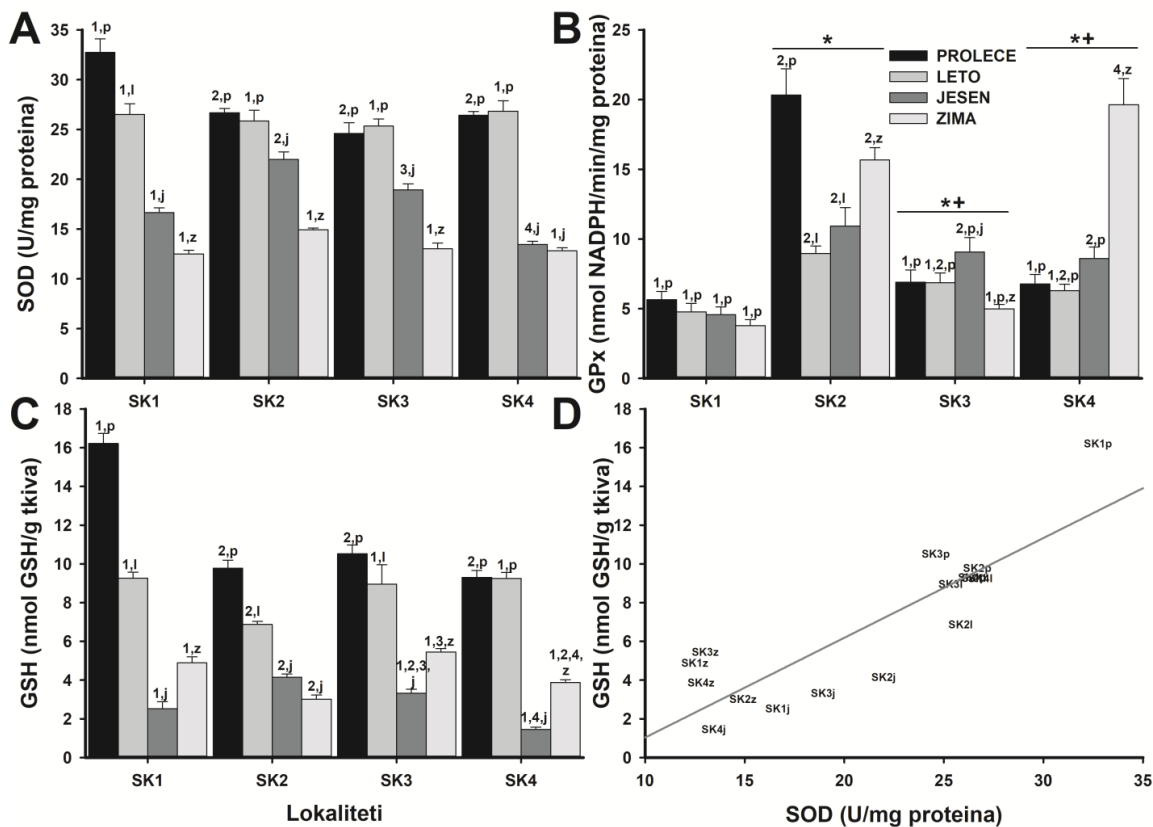
GPx u svim sezonama (Tabela 5) je na SK2 veća u odnosu na SK1, a zatim se u odnosu na ove vrednosti, na SK3 i SK4 se smanjuje. Izuzetak je zimska sezona, u kojoj na lokalitetu koji je najudaljeniji od ribnjaka raste njegova aktivnost. Na ovom lokalitetu, aktivnost GPx je u svim sezonama veća od aktivnosti enzima na kontrolnom, SK1 lokalitetu. Količina ukupnog glutaciona GSH je na SK2 u jesen veća, a u ostalim sezonama manja od količine izmerene na SK1 lokalitetu (Tabela 5). U jesen, količina ukupnog glutaciona GSH opada i na SK3 i na SK4, a u proleće i zimu, na SK3 dolazi do povećanja, a na SK4 do smanjenja količine GSH u odnosu na vrednosti sa SK2 (Tabela 5). U ove tri sezone, količina ukupnog glutaciona na najudaljenijem lokalitetu je manja od kontrolnih vrednosti. U toku letnje sezone, količina ukupnog glutaciona se na SK2 smanji u odnosu na SK1 lokalitet. S druge strane, na lokalitetima koji su nizvodno od lokaliteta SK2, dolazi do povećanja GSH, tako da je na lokalitetu SK4 njegova količina bliska kontrolnim vrednostima (Tabela 5).

Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da aktivnosti enzima SOD i GPx kao i količina ukupnog glutaciona, GSH, značajno ($P < 0,001$) variraju kako duž lokaliteta tako i tokom sezona. Između ova dva faktora postoji i značajna interakcija ($P < 0,001$), koja ukazuje na to da sezonske promene imaju značajan uticaj na longitudinalne promene i obratno. Međutim, u obrascu promena aktivnosti enzima SOD i GPx postoje značajne razlike

(Slika15).

Tabela 5. Aktivnost SOD i GPx i količina ukupnog glutationa, GSH u larvama *E. danica*

Sezona	SOD (U/mg proteina)				GPx (nmol NADPH/min/mg proteina)				GSH (nmol GSH/g tkiva)			
	Lokalitet				Lokalitet				Lokalitet			
	SK1	SK2	SK3	SK4	SK1	SK2	SK3	SK4	SK1	SK2	SK3	SK4
Proleće	32,7471	26,6844	24,6028	26,4277	5,65297	20,3308	6,90528	6,77184	16,2204	9,775	10,5174	9,30481
Leto	26,5066	25,8485	25,3421	26,8391	4,78459	8,9637	6,86089	6,28927	9,26239	6,87412	8,95835	9,25532
Jesen	16,6568	21,9842	18,9409	13,4519	4,58046	10,9348	9,07105	8,60058	2,52985	4,14633	3,32672	1,4536
Zima	12,4982	14,9217	13,0243	12,8133	3,79583	15,668	4,99742	19,6318	4,88874	3,01612	5,45107	3,87179



Slika 15. Promene: A) aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), B) glutation peroksidaze (GPx) i C) količine ukupnog glutationa (GSH) u larvama *E. danica* na četiri lokaliteta (SK1, SK2, SK3 i SK4) na reci Skrapež, u toku četiri sezone (proleće, leto, jesen, zima).

Uzorci sa različitih lokaliteta, a iz iste sezone koji se statistički značajno razlikuju su označeni različitim brojevima (1, 2, 3, 4). Uzorci iz različitih sezona i sa istih lokaliteta, a koji se statistički značajno razlikuju, obeleženi su različitim slovima (p, l, j, z). D) Efekti promena aktivnosti SOD na GSH na svim lokalitetima na reci Skrapež. Puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka ($R = 0,862$; $F = 40,3$, $P < 0,001$).

Aktivnost SOD karakteriše veća sezonska nego longitudinalna varijabilnost, i te razlike u aktivnosti SOD su statistički značajne na svim lokalitetima (Slika 15A). Na kontrolnom SK1 lokalitetu dolazi do monotonog opadanja aktivnosti SOD od proleća do zime. Sličan trend se zadržava i neposredno posle uliva otpadnih voda iz ribnjaka, s tim što zbog smanjenja njegove aktivnosti u proleće gubi razlika aktivnosti ovog enzima kod larvi

koje su uzorkovane u proleće i leto. Ako se analiziraju longitudinalne promene, jasno je da u toku leta i zime razlike između aktivnosti SOD na različitim lokalitetima ne postoje. U proleće, aktivnost SOD je značajno veća na kontrolnom lokalitetu (SK1) koji se nalazi iznad ribnjaka u odnosu na sve lokalitete neposredno ispod ribnjaka (SK2, SK3 i SK4). Najintenzivnije promene karakterišu jesenju sezonu, kada aktivnost SOD dostiže statistički značajan maksimum neposredno po ulivu otpadnih voda iz ribnjaka na lokalitetu SK2.

Aktivnost GPx karakteriše značajnija longitudinalna nego sezonska varijabilnost. Tako na kontrolnom SK1 lokalitetu nema statistički značajnog sezonskog variranja aktivnosti ovog enzima (Slika 15B). Slična je situacija i na lokalitetima SK3 i SK4, sa izuzetkom aktivnosti ovog enzima u zimu koja je na lokalitetu SK3 manja od aktivnosti u jesen, a na lokalitetu SK4 je značajno veća od aktivnosti GPx u ostalim sezonama. Nasuprot tome, na SK2 dolazi do značajnih sezonskih promena aktivnosti GPx koje odlikuje izrazit pad u leto i potom postepeni, ali nepotpuni, oporavak do zime (Slika 15B). Što se tiče longitudinalnih promena, u svim sezonama dolazi do statistički značajnog porasta aktivnosti GPx na SK2 u odnosu na kontrolni SK1 lokalitet, što prati oporavak ovog enzima na lokalitetima SK3 i SK4. Izuzetak je SOD u jesen na SK3 i u jesen i zimu na SK4, kada je njegova aktivnost značajno veća od kontrolne. Značajne razlike, u odnosu na lokalitet neposredno ispod ribnjaka, se uočavaju i u aktivnosti ovog enzima u proleće i zimu na SK3 i SK4, Slika 15B.

GSH opada tokom godine, a minimum dostiže u zimu na SK2, a u jesen na svim ostalim lokalitetima (Slika 15C). U odnosu na longitudinalne promene, GSH u proleće dostiže maksimum na kontrolnom SK1 lokalitetu, što je značajno više od količine ukupnog glutationa u larvama skupljenim u proleće na lokalitetima nizvodno od ribnjaka. I u toku ostalih sezona postoje značajne razlike između kontrolnog GHS i onog merenog na lokalitetim SK2, SK3 i SK4. Količina ukupnog glutationa značajno varira i u leto, i to između lokaliteta SK2 i SK3, kao i između SK2 i SK4. U jesen i zimu su te razlike značajne između lokaliteta neposredno ispod ribnjaka, s jedne strane, i SK4 i SK3, respektivno, sa druge strane (Slika 15C).

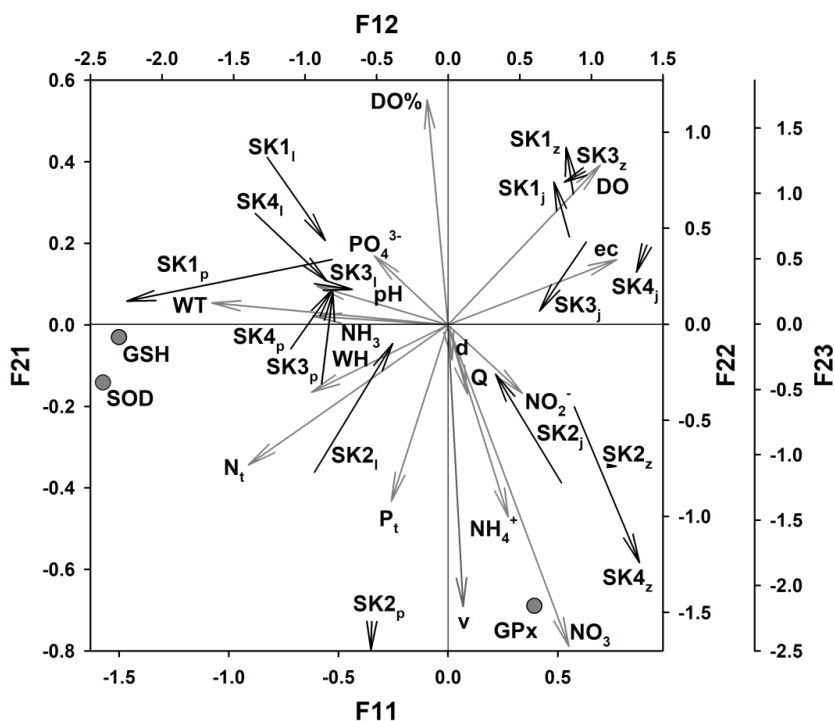
Količina ukupnog glutationa veoma blisko prati promene aktivnosti SOD, te ih karakteriše visok stepen korelacije ($R = 0,862$, $P < 0,001$; slika 15D), što nije slučaj sa aktivnošću GPx ($R = -0,192$, $P = 0,48$).

4.4. UPOREDNA ANALIZA SISTEMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, FIZIČKIH I HEMIJSKIH PARAMETARA VODE

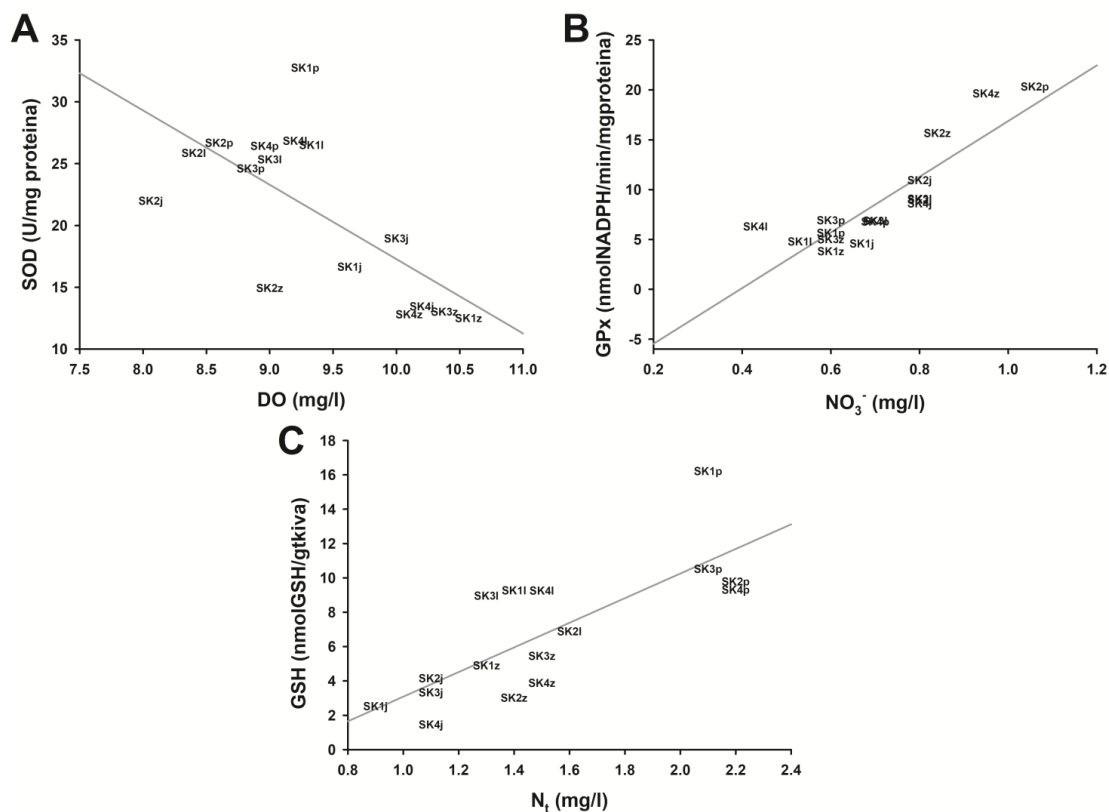
Analiza koinercije (CIA) korišćena je da bi se ispitaio uticaj promena hemijskih i fizičkih parametara vode u reci Skrapež, izazvanih otpadnim vodama pastrmskog ribnjaka, na aktivnost dva enzima antioksidativne odbrane i na količinu ukupnog glutationa u *E. danica* (Slika 16). Rezultati CIA analize pokazali su da postoji statistički vrlo značajna ($P < 0,001$) ko – struktura između korelacijske matrice PCA antioksidativnih enzima i korelacijske matrice PCA fizičkih i hemijskih parametara vode. Da bi se grafički prikazala ova ko -struktura, dve faktorske ose objašnjavaju gotovo celu (95%) ko-strukturu ($F1 = 64\%$, $F2 = 31\%$). Snaga ko-strukture potvrđena je relativno visokim vrednostima koeficijenta korelacije duž $F1$ (0,92) i $F2$ ose (0,84).

Analiza položaja uzoraka duž $F1$ ose u odnosu na abiotičke faktore (početak crnih strelica) i biomarkere (vrh crnih strelica) pokazuje da su oni poređani u pravilnom hronološkom nizu, počevši od prolećnih i letnjih uzoraka na njenom negativnom kraju, do jesenjih i zimskih uzoraka na pozitivnom kraju $F1$ ose (Slika 16). Stoga je $F1$ osa jasno označena kao osa sezonskih promena. Iz toga sledi da parametri koji su snažno vezani za $F1$ osu, karakterišu sezonske promene u većoj meri nego longitudinalne. I zaista, SOD i GSH za koje je pokazano da ih karakteriše značajno veća sezonska varijabilnost su tesno grupisani na negativnom kraju $F1$ ose, pošto su im prolećne i letnje vrednosti značajno veće od onih u jesen i zimu. Od abiotičkih faktora, najjaču vezu sa $F1$ osom pokazuju t_w i N_t , sa njenim negativnim krajem, a DO i ec sa pozitivnim krajem, dok nešto slabiju vezu sa negativnim krajem $F1$ ose ostvaruju WH i pH. Kod ovih parametara, sa izuzetkom DO, sezonska varijabilnost je značajno veća od longitudinalne, a oni usmereni ka negativnom kraju $F1$ ose dostižu maksimum u proleće ili leto, a minimum u jesen ili zimu. S druge strane, kod onih usmerenih ka pozitivnom kraju situacija je obrnuta. DO karakteriše

podjednaka sezonska i longitudinalna varijabilnost, pošto dostiže statistički značajan maksimum na lokalitetu SK2 i u zimu. CIA ukazuje da bi ovi abiotički parametri trebalo da imaju najveći uticaj na promene SOD i GSH. Korelaciona analiza ovo i potvrđuje, pošto SOD karakteriše statistički značajna korelacija sa t_w ($R = 0,834$, $P < 0,001$), DO ($R = 0,714$, $P = 0,002$, Slika 17A), WH ($R = 0,567$, $P = 0,022$) i N_t ($R = 0,592$, $P = 0,016$), a GSH sa t_w ($R = 0,647$, $P = 0,006$), pH ($R = 0,499$, $P = 0,049$), ec ($R = 0,655$, $P = 0,006$) i N_t ($R = 0,771$, $P < 0,001$, Slika 17C).



Slika 16. Analiza koinercije (CIA) 15 abiotičkih parametara i tri antioksidativna biomarkera za 16 uzoraka (četiri lokaliteta SK1 – SK4, četiri sezone: proleće, leto, jesen, zima). Normalizovane promenljive abiotičkih parametara (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode) predstavljene su sivim strelicama i projektovane na F11xF21 ravan. Položaji antioksidativnih biomarkera (sivi krugovi) su prikazani na CIA F11xF22 ravni (za skraćenice videti poglavlje Materijal i metode). Standardizovani rezultati analize koinercije abiotičkih parametara i antioksidativnih biomarkera za svaki uzorak (crne strelice) projektovani su na ravan F12xF23. Početak strelice smešta uzorak prema vrednostima abiotičkih faktora, a vrh strelice prema vrednostima antioksidativnih biomarkera.



Slika 17. Uticaj hemijskih parametara merenih u reci Skrapež na sistem antioksidativne zaštite larvi *E. danica*. A) Uticaj promene NO_3^- na aktivnost GPx. Puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka ($R = 0,853$, $F = 37,5$, $P < 0,001$). B) Uticaj promene DO na aktivnost SOD. Puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka ($R = -0,714$, $F = 14,6$, $P = 0,002$). C) Uticaj promene N_t na količinu ukupnog glutaciona, GSH. Puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka ($R = 0,771$, $F = 20,5$, $P < 0,001$).

Ako je F1 osa, osa sezonskih promena abiotičkih i biotičkih parametara, onda je F2 osa očigledno osa longitudinalnih promena. Duž F2 ose se može videti da su uzorci uzeti sa lokaliteta SK2 koji se nalazi odmah ispod ribnjaka jasno odvojeni od ostalih uzorkovanih u istoj sezoni na kontrolnom lokalitetu i lokalitetima koji su nizvodno od SK2 (SK3 i SK4). Stoga se F2 osa može smatrati osom uticaja pastrmskog ribnjaka. Aktivnost GPx za koju je pokazano da je karakteriše značajno veća longitudinalna varijabilnost je stoga blisko povezana sa F2 osom i to njenim negativnim krajem, pošto maksimum

aktivnosti u svim sezonama (osim zime) dostiže na SK2 (Slika 15B). Od abiotičkih faktora sa F2 osom su najčvršće povezani v, NO₃⁻, NH₄⁺ i P_t sa negativnim krajem i DO% sa pozitivnim (Slika 16). Svi ovi parametri statistički značajno opadaju (DO%) ili rastu (v, NO₃⁻, NH₄⁺ i P_t) na SK2 u odnosu na kontrolni lokalitet i osim NH₄⁺ i NO₃⁻ ih karakteriše statistički značajan oporavak nizvodno (Slika 14). Na to ukazuje i postojanje statistički značajne korelacije između aktivnosti GPx i v (R = 0,706, P = 0,002), DO% (R = -0,545, P = 0,029), NH₄⁺ (R = 0,501, P = 0,048) i NO₃⁻ (R = 0,853, P < 0,001, Slika 17B).

4.5. ANALIZA TEŠKIH METALA U TELU LARVI *E. DANICA*, VODI I SEDIMENTU

U larvama *E. danica*, od svih analiziranih teških metala, najmanje je zastupljen kadmijum – u jesen na SK2 lokalitetu. S druge strane, najzastupljeniji metal je gvožđe (leto, SK2 lokalitet). Najveće koncentracije arsena i hroma kod ovih larvi su izmerene u proleće (na SK4 i SK3: 3,79 i 45,3 mg/kg, respektivno), a najmanje u leto na SK1 (arsen: 1,52 mg/kg) i SK4 (hrom: 19,6 mg/kg). Kao što je već naglašeno, najmanja koncentracija kadmijuma zabeležena je u jesen (0,33 mg/kg), a u ovoj sezoni je kod larvi sa SK4 lokaliteta izmerena i najviša koncentracija ovog teškog metala (0,66 mg/kg). U larvama *E. danica* u različitim sezonama i na različitim lokalitetima, postoje velike razlike u koncentraciji bakra: najmanja koncentracija je zabeležena na SK4 u jesen (21,7 mg/kg), a najviša na SK2 u leto (239,0 mg/kg). Koncentracije gvožđa u larvama su izrazito veće u odnosu na sve druge teške metale. Kao što je već rečeno, njegova najveća koncentracija je zabeležena u leto na SK2 lokalitetu (1933,5 mg/kg), a najmanja u jesen na SK4 (348,3 mg/kg). Što se tiče koncentracije mangana, ona je najveća kod larvi skupljenih u proleće na SK3 (478,4 mg/kg), a najmanja kod onih koje su skupljene u jesen na SK4 (135,6 mg/kg). Najveće koncentracije nikla i olova u larvama su u proleće na SK2 lokalitetu (11,33 i 11,1 mg/kg, respektivno), a najmanje u leto na SK3 (nikl:4,4 mg/kg) i proleće na SK4 (olovo: 1,51 mg/kg), Tabela 6.

Analize vode iz reke Skrapež su pokazale da je, od svih analiziranih teških metala, kadmijum prisutan u najmanjoj koncentraciji, koja je u leto, jesen i zimu na svim

lokalitetima bila ispod 0,1 µg/L (Tabela 7). U analiziranoj vodi, najzastupljeniji teški metal je gvožđe, koji najvišu koncentraciju dostiže u jesen na drugom, SK2, lokalitetu. Njegova koncentracija najviše varira, kako po lokalitetima, tako i sezonski, na šta ukazuju koncentracije ovog teškog metala izmerene na lokalitetu SK2 u jesen (259,30 µg/L) i zimu (manja od 0,1 µg/L). Tokom jesenje sezone, na lokalitetu SK2 koncentracija mangana je iznosila 15,42 µg/L, što je mnogo više u poređenju sa koncentracijom ovog metala na ostalim lokalitetima i sezonama (Tabela 7).

U sedimentom materijalu iz reke Skrapež, najmanje je zastupljen kadmijum i njegova koncentracija je u većini uzoraka bila manja od 0,05 µg/g (SK1: zima; SK2: proleće, leto i jesen; SK4: leto, jesen i zima), Tabela 8. Najveće koncentracije su, kao i u vodi i u larvama (Tabele 6 i 7), zabeležene za gvožđe (Tabela 8). U odnosu na druge teške metale, hroma, mangana i nikla su u sedimentu prisutni u većim koncentracijama. Najveća koncentracija hroma je zabeležena na kontrolnom lokalitetu u zimu (763,00 µg/g), dok su u sedimentu na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka, izmerene i najviše koncentracije nikla (leto, 609,00 µg/g) i mangana (zima, 789,00 µg/g) (Tabela 8).

Tabela 6. Koncentracija teških metala u larvama *E. danica* (P-proleće, L-leto, J-jesen, Z-zima)

		SK1-P	SK2-P	SK3-P	SK4-P	SK1-L	SK2-L	SK3-L	SK4-L	SK1-J	SK2-J	SK3-J	SK4-J	SK1-Z	SK2-Z	SK3-Z	SK4-Z
Arsen	mg/kg	3,64	2,67	2,91	3,79	1,52	2,32	2,05	3,16	3,41	2,55	2,79	3,64	1,61	2,22	2,12	3,32
Hrom	mg/kg	26,2	31,2	45,3	34,1	27	31,7	21,4	19,6	24,9	30,4	43,1	35,3	28,1	30,9	21,8	21,1
Kadmijum	mg/kg	0,54	0,36	0,55	0,64	0,49	0,41	0,39	0,38	0,51	0,33	0,52	0,66	0,54	0,38	0,48	0,35
Bakar	mg/kg	102,3	220	39,8	22,8	121,4	239	79,6	89,8	117,2	208,8	37,9	21,7	144,8	216,9	77,8	92,5
Gvožđe	mg/kg	751,1	1201	479	362,5	881,7	1933,5	708,3	744,6	713,7	1134,1	455,8	348,3	933,2	1410,8	673,2	804,5
Mangan	mg/kg	247,1	220	478,4	174,3	174,1	227,1	180,3	181	211	205,7	336,2	135,6	240,4	213,9	203,8	161,5
Nikl	mg/L	5,8	11,33	10,27	8,04	6,52	6,34	4,4	5	4,52	9,16	7,75	6,48	9,62	4,88	5,74	7,83
Olovo	mg/L	2,82	11,1	2,61	1,51	3,9	10,72	4,46	4,18	3,05	7,51	3,34	2,04	8,12	8,55	4,09	5,84

Tabela 7. Koncentracija teških metala u vodi iz reke Skrapež (P-proleće, L-leto, J-jesen, Z-zima)

		SK1-P	SK2-P	SK3-P	SK4-P	SK1-L	SK2-L	SK3-L	SK4-L	SK1-J	SK2-J	SK3-J	SK4-J	SK1-Z	SK2-Z	SK3-Z	SK4-Z
Arsen	mg/L	2	1,89	3,23	1,28	0,31	<0.1	<0.1	<0.1	0,28	<0.1	1,86	2,14	3,32	1,59	2,09	1,36
Kadmijum	mg/L	0,05	0,09	0,12	0,22	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Hrom	mg/L	3,78	3,66	3,72	3,78	3,85	4,54	4,36	4,64	4,67	6,48	5,12	4,44	3,92	2,29	3,66	3,75
Bakar	mg/L	4,46	7,8	5,13	4,41	0,82	0,38	0,91	0,64	0,89	2,53	0,78	1,87	1,18	0,43	7,78	1
Gvožđe	mg/L	6,43	3,46	33,01	10,15	25,28	71,52	119,6	51,32	62,24	259,3	83,75	52,92	1,71	<0.1	0,83	0,04
Mangan	mg/L	1,1	1,15	4,04	1,85	2,21	3,96	6,49	2,97	3,76	15,42	4,55	3,99	<0.1	2,5	<0.1	<0.1
Nikl	mg/L	2,13	2,1	2,94	2,21	2,06	3,03	4,52	2,64	3,15	8,65	3,7	3,46	1,7	1,6	1,72	2,14
Olovo	mg/L	1,01	1,15	1,12	0,95	1,6	1,64	1,11	1,68	0,39	1,74	1,74	1,64	1,51	1,6	1,67	1,01

Tabela 8. Koncentracija teških metala u sedimentu iz reke Skrapež (P-proleće, L-leto, J-jesen, Z-zima)

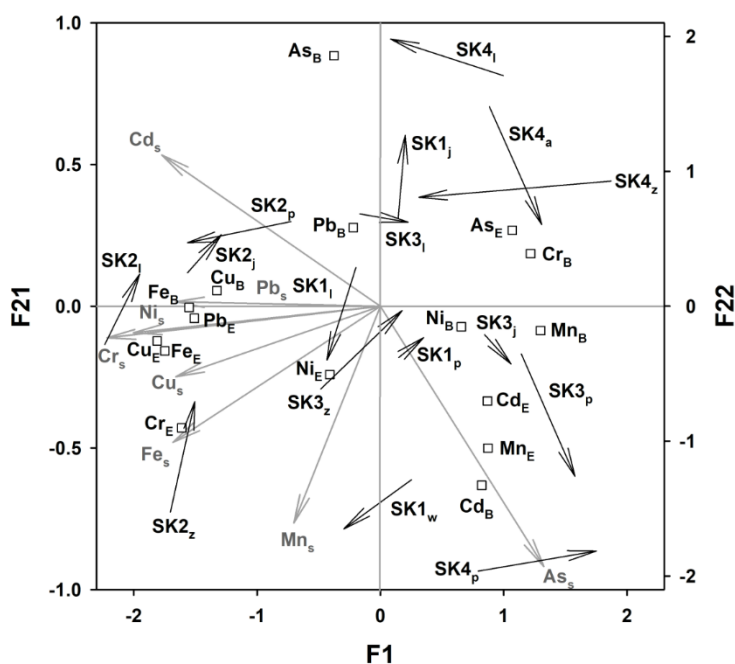
		SK1-P	SK2-P	SK3-P	SK4-P	SK1-L	SK2-L	SK3-L	SK4-L	SK1-J	SK2-J	SK3-J	SK4-J	SK1-Z	SK2-Z	SK3-Z	SK4-Z
Arsen	µg/g	0,447	<0.05	1,012	1,122	0,212	<0.05	0,057	<0.05	<0.05	<0.05	0,706	<0.05	0,565	0,753	0,321	0,889
Kadmijum	µg/g	0,063	0,039	0,068	0,026	0,067	0,097	0,057	0,053	0,059	0,08	0,058	0,066	0,021	0,091	0,056	0,047
Hrom	µg/g	384,35	550	248,45	357,8	426,45	427,95	328,8	304	335,45	543,5	271,55	284,6	763	559,5	364,75	277,85
Bakar	µg/g	16,86	16,34	15,495	16,17	17,325	23,17	16,33	13,395	17,1	20,345	17,665	14,66	15,94	21,145	17,87	11,705
Gvožđe	µg/g	21950	22385	19575	24275	21040	24165	21090	19020	21320	23745	20310	18985	23575	25000	22420	18275
Mangan	µg/g	699	554	627	700	657,5	750,5	641	531	603,5	613	639	519,5	704	789	730,5	437,45
Nikl	µg/g	413,5	503,5	396,95	405,75	456,7	609	413,85	361,95	464,9	554,5	400,35	417,6	591	495,2	535,5	359,75
Olovo	µg/g	3,867	4,204	4,071	3,665	4,438	9,025	8,45	3,417	3,513	6,22	2,843	3,87	4,475	7,435	5,67	3,007

4.5.1. Uporedna analiza koncentracije teških metala u sedimentu, vodi i larvama *E. danica* izražene preko BSAF faktora

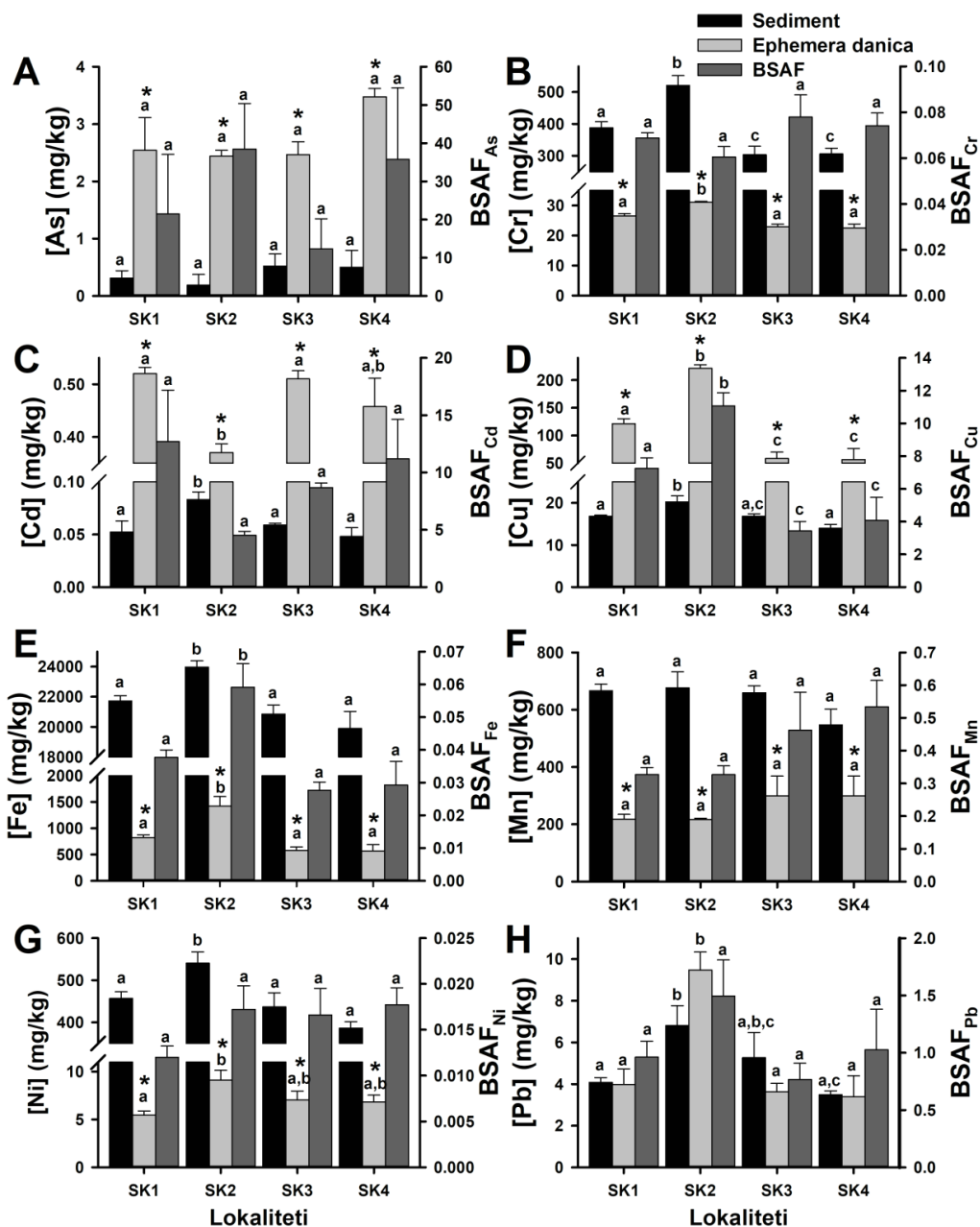
Da bi se procenili odnosi koncentracije teških metala u sedimentu s jedne strane i njihove koncentracije i sposobnosti akumulacije (merene preko Biota Sediment Accumulation Factor – BSAF) u larvama *E. danica*, s druge strane, kao i uticaj otpadnih voda pastrmskog ribnjaka na ove procese, korišćena je analiza koinercije (CIA). CIA je pokazala postojanje statistički visoko značajne ($P < 0,001$) ko-strukture između PCA korelacione matrice koncentracija teških metala u sedimentu i PCA korelacione matrice koncentracije teških metala u larvama *E. danica* i BSAF. Da bi se grafički prikazala posmatrana ko-struktura zadržane su dve faktorijske ose, F1 osa koja objašnjava većinu ko-strukture (85,7%) i F2 osa koja objašnjava samo njen mali deo (7,7%). Veliku snagu ko-strukture su pokazale visoke vrednosti koeficijenta korelacije duž F1 (0,83) i F2 ose (0,87), kao i mala dužina strelica koje predstavljaju položaje četiri lokaliteta na reci Skrapež (Slika 18).

Analiza koncentracija metala u sedimentu pokazuje da se vektori koji predstavljaju koncentracije gvožđa (Fe_s), bakra (Cu_s), hroma (Cr_s), nikla (Ni_s), olova (Pb_s) i kadmijuma (Cd_s), pružaju duž F1 ose i da su usmereni ka njenom negativnom kraju. Na negativnom kraju F1 ose jasno su izdvojene pozicije svih sezona lokaliteta SK2 (počeci crnih strelica), koji se nalazi neposredno posle uliva otpadnih voda ribnjaka, od pozicija ostalih lokaliteta koje su smeštene ili oko sredine F1 ose (sve sezone kontrolnog lokaliteta SK1 i zima i leto lokaliteta SK3) ili na njenom pozitivnom kraju (sve sezone lokaliteta SK4, kao i jesen i proleće lokaliteta SK3). Osa F1 se može nazvati osom efekta ribnjaka. Smanjenje koncentracija metala se nastavlja dalje nizvodno, tako da su na lokalitetu SK4 njihove koncentracije niže nego na kontrolnom SK1 lokalitetu. Duž F1 ose koja objašnjava daleko najveći deo ukupnog variranja podataka sezonski uzorci za svaki od lokaliteta (sa izuzetkom SK3) su veoma blisko postavljeni, što ukazuje da su sezonske varijacije koncentracije pomenutih metala u sedimentu daleko manje nego longitudinalne. U skladu sa rezultatima CIA, One-way ANOVA je pokazala da Cr_s , Cd_s , Cu_s , Fe_s , Ni_s i Pb_s statistički značajno rastu na SK2 u odnosu na SK1, a potom, u odnosu na SK2, statistički značajno

opadaju na SK3 i SK4 sa izuzetkom koncentracije Pb_s , gde do statistički značajnog pada dolazi tek na SK4 (Slika 19B-E, G, H). Takođe, koncentracije ovih metala u sedimentu sa lokaliteta SK4 su bez izuzetka manje nego na SK1, ali je taj pad statistički značajan samo u slučaju Cr_s (Slika 19B). U slučaju koncentracija arsena i mangana u sedimentu (As_s , odnosno Mn_s) nema statistički značajnih razlika između lokaliteta, a koncentracija As_s je čak nešto manja na SK2 u odnosu na ostale lokalitete (Slika 19A, F). Ovo je posledica većih sezonskih varijacija u odnosu na longitudinalne, na šta ukazuje i CIA gde su vektori ova dva metala vezani za F2 osu koja predstavlja osu sezonskih varijacija.



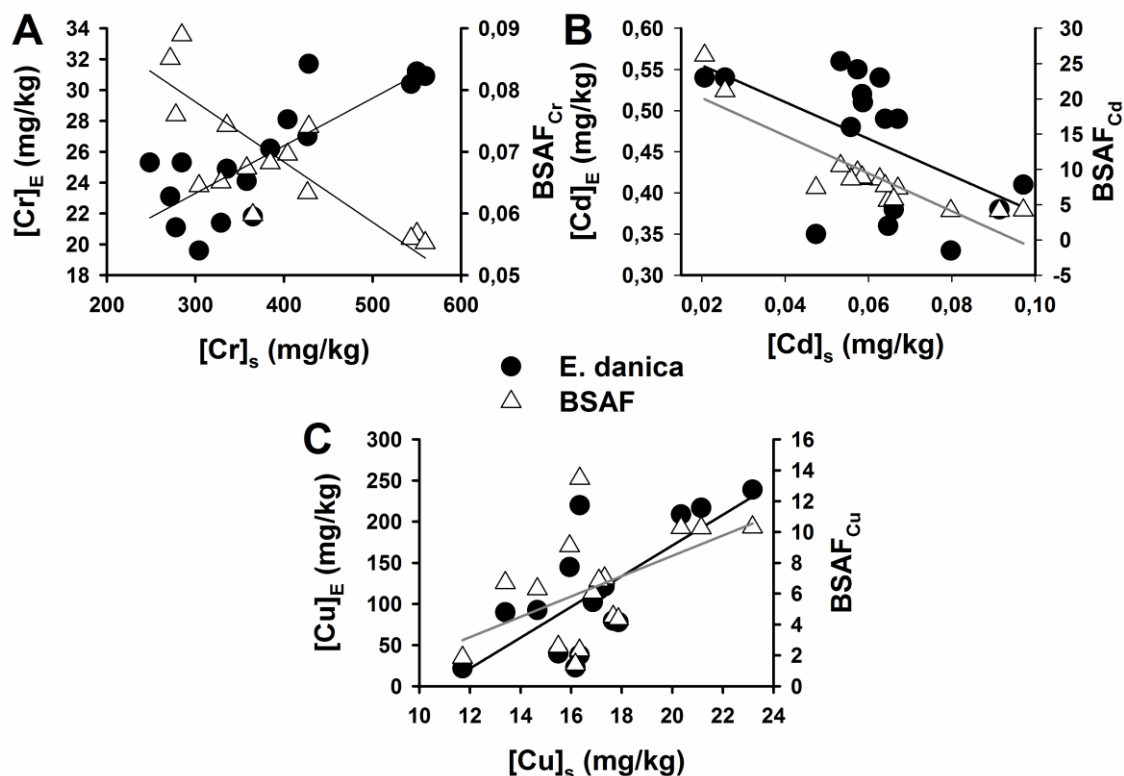
Slika 18. Triplot prezentacija analize koinercije (CIA) koncentracija osam metala u sedimentu i u larvama *E. danica* i njihovog BSAF iz 16 uzoraka (četiri lokaliteta, četiri sezone). Koncentracije metala (As_s , Cd_s , Cr_s , Cu_s , Fe_s , Mn_s , Ni_s , and Pb_s) u sedimentu su prikazane sivim strelicama i projektovane na F1xF21 ravan. Položaj koncentracija metala u larvama *E. danica* i njihov BSAF, otvoreni kvadrati, su takođe prikazani u CIA F1xF21 ravni. Standardizovani CIA rezultati za sediment i larve *E. danica* za svaki uzorak (crne strelice) projektovani su na F1xF22 ravan. Početak strelice smešta uzorak prema koncentraciji metala u sedimentu, a vrh strelice raspoređuje je prema koncentraciji metala u *E. danica* i njegovom BSAF.



Slika 19. Promene prosečnih koncentracija metala u sedimentu (crni barovi) i kod larvi *E. danica* (sivi barovi) i njihov BSAF (tamno sivi barovi) za arsen (A), hrom (B), kadmijum (C), bakar (D), gvožđe (E), mangan (F), nikl (G) i olovo (H) na četiri lokaliteta (SK1, SK2, SK3 i SK4) na reci Skrapež. Uzorci sa različitih lokaliteta za svaki parametar koji se značajno razlikuje obeleženi su različitim slovima (a, b, c). * $P < 0,05$ značajna razlika između koncentracija metala u sedimentu i u larvama *E. danica*.

Analiza koinercije (CIA) koncentracija metala u larvama *E. danica* pokazuje da su koncentracije hroma (Cr_E), bakra (Cu_E), gvožđa (Fe_E) i olova (Pb_E), baš kao i koncentracije ovih metala u sedimentu vezane za negativni kraj F1 ose i pozitivno su korelisane sa koncentracijama u sedimentu (Slika 18). ANOVA je pokazala da ove metale karakteriše statistički veća koncentracija na SK2 u odnosu na ostale lokalitete. Takođe, koncentracije sva četiri metala u *E. danica* pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa koncentracijom odgovarajućeg metala u sedimentu i to za Cr_E ($R = 0,80$, $P < 0,001$, Slika 20A), za Cu_E ($R = 0,72$, $P = 0,002$, Slika 20C), za Fe_E ($R = 0,634$, $P = 0,008$) i za Pb_E ($R = 0,57$, $P = 0,021$).

Analiza koinercije (CIA) je pokazala da je koncentracija kadmijuma u *E. danica* (Cd_E) smeštena nasuprot vektoru Cds što ukazuje da se njihove vrednosti menjaju suprotnosmerno, pa je tako ANOVA pokazala da je Cd_E na SK2 statistički značajno manja u odnosu na SK1 i SK3 (Slika 19C), a Piersonov test da su Cds i Cd_E negativno korelisane ($R = 0,54$, $P = 0,030$). Na CIA grafiku, položaji koncentracija arsena, nikla i mangana u *E. danica* (As_E , Ni_E , odnosno Mn_E) se nalaze gotovo pod pravim uglom u odnosu na vektore koncentracija odgovarajućih metala u sedimentu (Slika 18), pa izostaje i statistički značajna korelacija između njih. Samo u slučaju Ni_E dolazi do statistički značajnog porasta na SK2 u odnosu na SK1 (Slika 19G), dok u slučaju As_E i Mn_E nema statistički značajnih razlika između lokaliteta (Slika 19A, F). Ako se porede koncentracije odgovarajućeg metala u *E. danica* i sedimentu, t-test pokazuje da u slučaju svih metala, izuzev Pb, i to na svakom od ispitivanih lokaliteta postoji statistički značajna razlika (Slika 19).



Slika 20. Uticaj koncentracije metala u sedimentu na koncentraciju metala u larvama *E. danica* i njihov BSAF. A) Uticaj promena koncentracije Cr u sedimentu (Cr_s) na njegovu koncentraciju u *E. danica* (Cr_E , crni krugovi) i BSAF (Cr_B , otvoreni trouglovi) na četiri lokaliteta na reci Skrapež. Crna puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka za Cr_E ($R = 0,80$, $P < 0,001$), a siva linija za Cr_B ($R = -0,77$, $P < 0,001$). B) Uticaj promena koncentracije Cd u sedimentu (Cd_s) na njegovu koncentraciju u larvama *E. danica* (Cd_E , crni krugovi) i BSAF (Cd_B , otvoreni trouglovi) na lokalitetima na reci Skrapež. Crna puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka za Cd_E ($R = -0,54$, $P = 0,030$), a siva linija za Cd_B ($R = -0,88$, $P < 0,001$). C) Uticaj promena koncentracije Cu u sedimentu (Cu_s) na njegovu koncentraciju u *E. danica* (Cu_E , crni krugovi) i BSAF (Cu_B , otvoreni trouglovi) na istraživanim lokalitetima na reci Skrapež. Crna puna linija predstavlja linearno uklapanje podataka za Cu_E ($R = 0,72$, $P = 0,002$), a siva linija za Cd_B ($R = 0,53$, $P = 0,036$).

Na smer ovih razlika ukazuju vrednosti BSAF. One su u slučaju arsena (As_B), kadmijuma (Cd_B) i bakra (Cu_B) pozitivne, što ukazuje da ove metale *E. danica* akumulira više u odnosu na sediment (Slika 19A, C, D). Akumulacija je najizraženija u slučaju arsena gde je $As_B = 27 \pm 7$, dok su nešto manje, ali i dalje značajne vrednosti za $Cd_B = 9,3 \pm 1,5$ i $Cu_B = 6,5 \pm 0,9$. U slučaju olova, Pb_B je bliska jedinici (Slika 19H), što znači da su mu koncentracije u sedimentu i *E. danica* podjednake, dok je u slučaju ostalih metala ta vrednost značajno manja od jedinice (Slika 19B, E, F, G), što znači da ne dolazi do njihove akumulacije u larvama *E. danica*. Ovo je posebno izraženo u slučaju Ni gde, čija je koncentracija u larvama *E. danica* 60 puta manje nego u sedimentu ($Ni_B = 0,016 \pm 0,001$).

Ako se analizira odnos između koncentracija metala u sedimentu i njihovog BSAF, CIA pokazuje da su Cu_B i Fe_B vezane za negativni kraj F1 ose (Slika 18), te da ih karakteriše pozitivna korelacija sa koncentracijama u sedimentu ($R = 0,53$ i $P = 0,036$ za Cu_B , Slika 20C; $R = 0,51$ i $P = 0,044$ za Fe_B). Pored toga, ANOVA je pokazala da vrednosti Cu_B i Fe_B dostižu statistički značajan maksimum na SK2 (Slika 19D, E). As_B , Cr_B i Cd_B su smeštene nasuprot vektorima njihovih koncentracija u sedimentu, te ih karakteriše negativna korelacija ($R = 0,80$ i $P < 0,001$ za As_B ; $R = 0,77$ i $P = < 0,001$ za Cr_B Slika 20A i $R = 0,88$ i $P < 0,001$ za Cd_B Slika 20B).

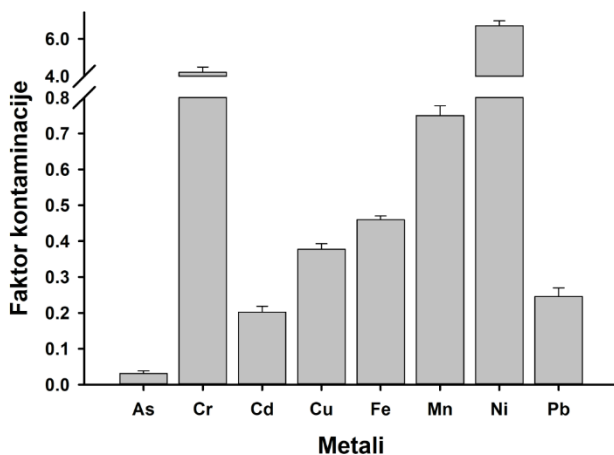
Da bi se ispitao potencijalni uticaj koncentracija ispitivanih metala u vodi na njihovu koncentraciju i sposobnost akumulacije u larvama *E. danica*, korišćena je CIA, koja je pokazala da ne postoji statistički značajna ($P = 0,7$) ko-struktura između PCA korelacione matrice koncentracija teških metala u vodi i PCA korelacione matrice koncentracije teških metala u *E. danica* i BSAF, te analiza nije mogla biti završena (Tabela 9).

Tabela 9. Koncentracije teških metala u vodi po lokalitetima

Metali/Lokaliteti	SK1	SK2	SK3	SK4
As	1,48±0,73 ^a	0,87±0,50 ^a	1,79±0,67 ^a	1,19±0,44 ^a
Cr	4,05±0,21 ^a	4,24±0,88 ^a	4,21±0,34 ^a	4,15±0,23 ^a
Cd	0,012±0,012 ^a	0,023±0,023 ^a	0,029±0,029 ^a	0,056±0,056 ^a
Cu	1,83±0,88 ^a	2,79±1,75 ^a	3,65±1,71 ^a	1,98±0,85 ^a
Fe	23,91±13,75 ^a	83,57±60,85 ^a	59,30±26,37 ^a	28,61±13,74 ^a
Mn	1,77±0,80 ^a	5,76±3,27 ^a	3,77±1,36 ^a	2,20±0,85 ^a
Ni	2,26±0,31 ^a	3,84±1,63 ^a	3,22±0,59 ^a	2,61±0,30 ^a
Pb	1,13±0,28 ^a	1,53±0,13 ^a	1,41±0,17 ^a	1,32±0,20 ^a

4.5.2. Faktor kontaminacije sedimenta (CF)

Ako se analiziraju vrednosti Faktora kontaminacije koje pokazuju odstupanje izmerenih koncentracija metala od prosečnih vrednosti kontinentalnih škriljaca (odgovaraju preindustrijskim vrednostima koncentracije ovih metala), jasno se uočava da najveći stepen kontaminacije karakteriše Ni_s (CF = 6,7±0,3) i Cr_s (CF = 4,2±0,3), dok su koncentracije svih ostalih metala manje od prosečnih vrednosti kontinentalnih škriljaca, a posebno su niske za As_s gde je CF = 0,031±0,007 (Slika 21).

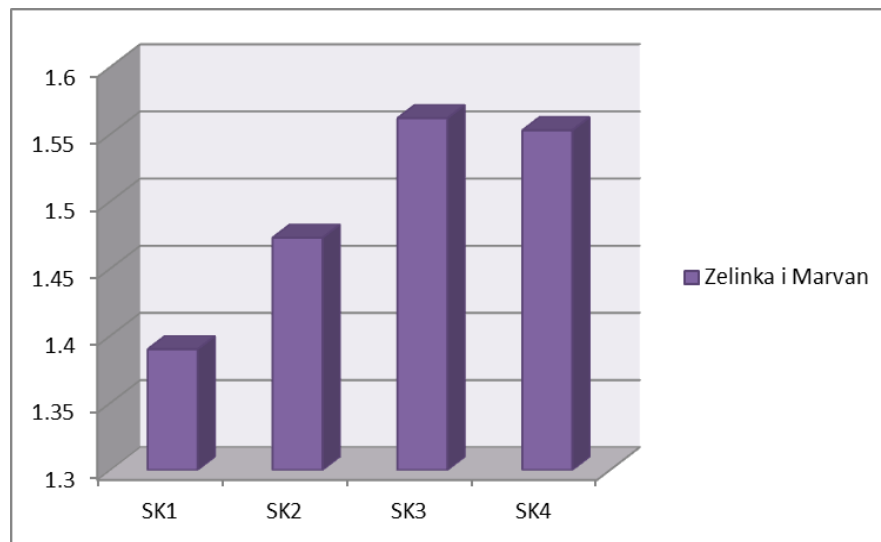


Slika 21. Promene prosečnih vrednosti faktora kontaminacije za arsen (As), hrom (Cr), kadmijum (Cd), bakar (Cu), gvožđe (Fe), magnezijum (Mn), nikl (Ni) i olovo (Pb).

4.6. REZULTATI EKOLOŠKIH ANALIZA

4.6.1. Analiza vrednosti saprobnog indeksa Zelinka i Marvan

Rezultati Asterix programa za izračunavanje različitih grupa indeksa pokazuju da je srednja vrednost saprobnog indeksa Zelinke i Marvana (Zelinka & Marvan, 1961) (Grafik 5) najveći na lokalitetu SK3 (1,56), i nešto niža na SK4 (1.55). Na lokalitetima SK1 i SK2, srednja vrednost saprobnog indeksa iznosila je 1,39, odnosno 1,47. Na osnovu ovih vrednosti zaključujemo da je voda na prvom (SK1) i drugom (SK2) lokalitetu oligosaprobnna, dok je na trećem (SK3) i četvrtom (SK4) lokalitetu oligo-beta-mezosaprobnna. Saprobiološka analiza ukazuje na činjenicu da se kvalitet vode pogoršava na lokalitetima koji su ispod ribnjaka i da se taj uticaj najviše odražava na treći (SK3) lokalitet.

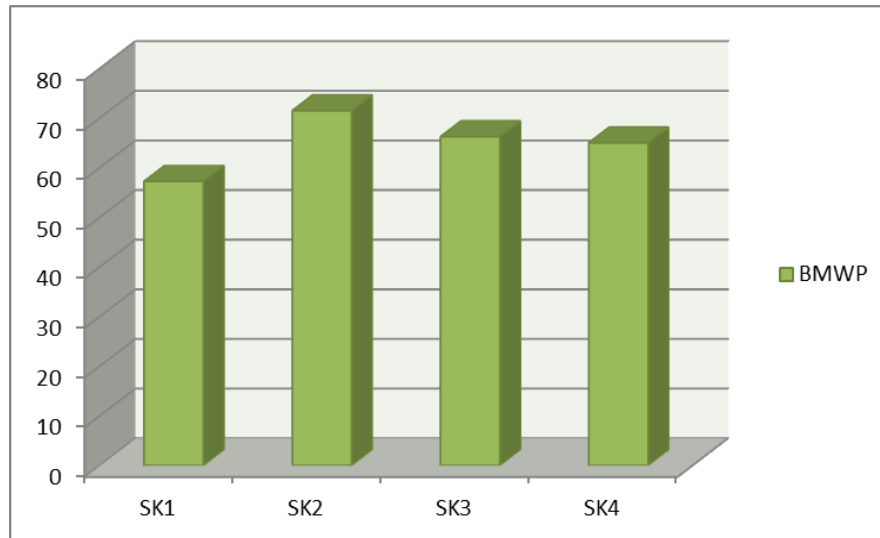


Grafik 5. Vrednosti saprobnog indeksa po Zelinki i Marvanu na istraživanim lokalitetima

4.6.2. Analiza biotičkog BMWP indeksa

Analizirajući rezultate dobijene za BMWP indeks (Grafik 6), uočavamo da kvalitet vode na svim lokalitetima, izuzev drugog (SK2), spada u izmenjen kvalitet vode, a na SK2 je na samoj granici između izmenjenog i dobrog kvaliteta vode. Suprotno očekivanjima, na

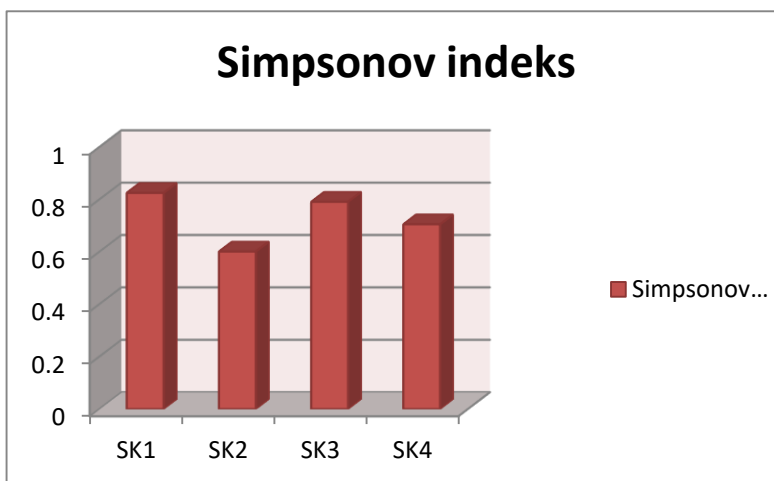
prvom, kontrolnom lokalitetu (SK1) srednja vrednost BMWP indeksa je najmanja (57), što ukazuje na činjenicu da je tu voda najlošijeg kvaliteta u odnosu na sve druge lokalitete.



Grafik 6. Vrednosti biotičkog indeksa (BMWP) na istraživanim lokalitetima

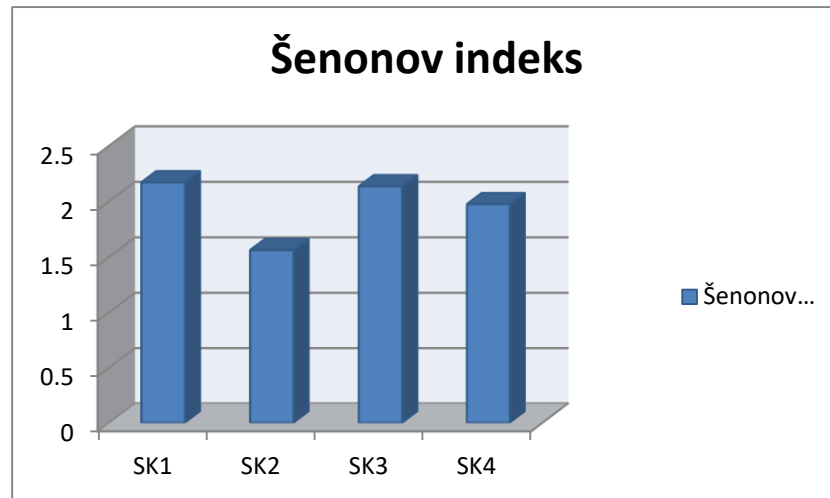
4.6.3. Analiza indeksa diverziteta (Šenon- Winerov i Simpsonov indeks)

Srednja vrednost Simpsonovog indeksa (Grafik 7) je najveća na SK1 (0.83), što ukazuje i na najveći diverzitet vrsta na ovom lokalitetu. S druge strane, vrednost ovog indeksa je najmanja na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka (0,6), SK2, što se dovodi u vezu sa najmanjim diverzitetom vrsta.



Grafik 7. Vrednosti Simpsonovog indeksa na istraživanim lokalitetima

Da je diverzitet vrsta najmanji na SK2 lokalitetu, a najveći na SK1, potvrđeno je i Šenon-Winerovim indeksom (Grafik 8).

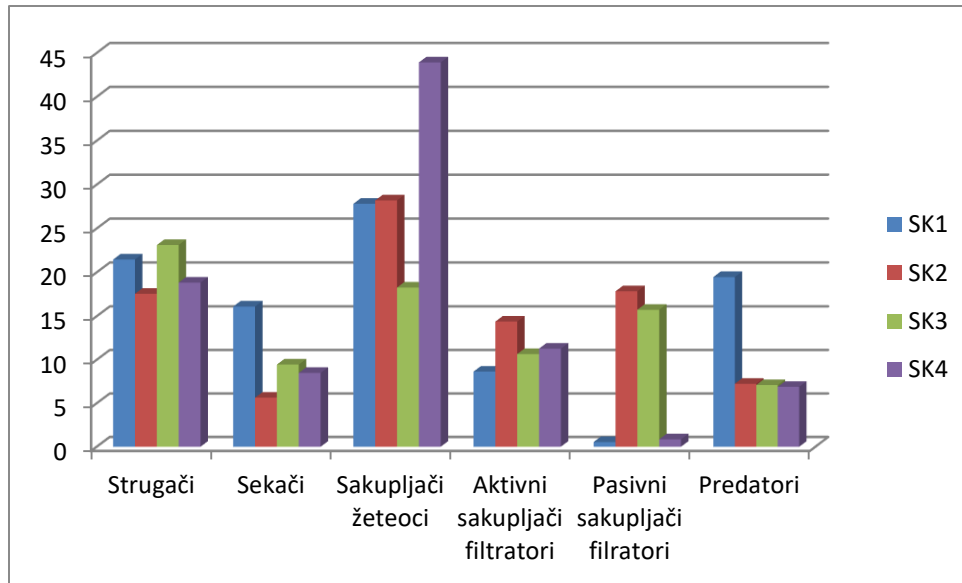


Grafik 8. Vrednosti Šenon-ovog indeksa na istraživanim lokalitetima

4.6.4. Analiza funkcionalnih trofičkih grupa na reci Skrapež

Različite trofičke grupe koje su osetljive na zagađenja organskog tipa su različito zastupljene na lokalitetima u reci Skrapež. Što se tiče strugača, srednje vrednosti procenatualne zastupljenosti na SK1 lokalitetu iznosi 21,46%, a na SK2 17,55%. Dalje niz vodotok, prosečna zastupljenost se povećava (23,11%), pa smanjuje (19,02%). Sličan trend promene prosečne učestalosti na četiri lokaliteta imaju i sekači: najviše ih je na SK1 (16,1%), i učestalost im opada na SK2 lokalitetu (5,64%), da bi se njihov udeo u zajednici povećao na SK3 (9,45%) i neznatno opao na SK4 lokalitetu (8,49%). Prosečna zastupljenost sakupljača žetelaca je približno ujednačena na SK1 i SK2 lokalitetu (27,81% i 28,19%), a zatim opada na SK3 (18,27%). Najviše ovih organizama je zabeleženo na četvrtom, SK4 lokalitetu, na kome njihova prosečna zastupljenost iznosi 43,91%. Aktivnih i pasivnih sakupljača filtratora je najviše na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka, SK2 (prosečne zastupljenosti 14,39%, odnosno 17,84%) što je posledica njegovog direktnog uticaja. Predatori su najzastupljeniji na kontrolnom SK1 lokalitetu (prosečna učestalost

19,46%), dok se na ostala tri lokaliteta (SK2, SK3 i SK4) njihova prosečna učestalost smanjuje i ima približne vrednosti (7,23%, 7,09% i 6,88%) (Grafik 9).



Grafik 9. Procentualna zastupljenost funkcionalnih trofičkih grupa na istraživanim lokalitetima

4. *DISKUSIJA*

Poslednjih decenija vodena sredina je izložena različitim negativnim antropogenim uticajima, koji vode poreklo od intezivne poljoprivrede i raznih industrijskih postrojenja. Tako, u akvatičnu sredinu dospevaju teški metali, azotna i fosforna jedinjenja, pesticidi, fenolna jedinjenja, kao i mnogi drugi ksenobiotici koji dovode do remećenja homeostaze akvatičnih organizama (Estevez i sar., 2017). Akvatični organizmi unose ove zagađujuće materije na više načina: preko vode, sedimenta, suspendovanih čestica i hrane i na taj način oni dospevaju u lance ishrane vodenih ekosistema. Poslednjih godina za procenu stepena potencijalnih zagađivača se koriste biomarkeri oksidativnog stresa (videti poglavlje 1.1.3.). Njihova analiza svakako predstavlja izazov za studije biomonitoringa, koji na taj način poprima novu dimenziju fiziološkog monitoringa, na biohemijском i molekularno - biološkom nivou. Potencijal i značaj ovakvih istraživanja je ogroman, s obzirom na to da otvara mogućnost predviđanja efekata zagađenja na populacije kroz odgovor pojedinačnih jedinki na stres (Gremyatchikh i sar., 2009; Mirčić i sar., 2016; Živić i sar., 2018; Radojević i sar., 2019). Određivanjem enzima antioksidativnog stresa kod akvatičnih organizama dobija se informacija o potencijalnom prisustvu prooksidanasa u akvatičnoj sredini. Shodno tome, korišćenjem biomarkera u monitoringu akvatičnih ekosistema mogu se otkriti rani signali o promenama nastalim u životnoj sredini, što takođe pruža mogućnost da se shvate molekularni mehanizmi dejstva zagađivača (Živić i sar., 2018). Za model organizam, kod kojeg su analizirani biomarkeri oksidativnog stresa, odabrana je senzitivna vrsta vodenih cvetova *Ephemera danica* (videti poglavlje 1.5.) što je ujedno i prva studija fiziološkog monitoringa na ovoj vrsti insekta. Preko brzih fizioloških reakcija jedinki *E. danica* mogu se uočiti na vreme promene koje će se neminovno desiti u celoj zajednici makroinvertebrata (Gremyatchikh i sar., 2009; Božanić i sar., 2018). Ako se zna da se kod nas i u svetu, proučavanje fiziologije insekata uglavnom svodi na proučavanje vrsta koje se lako gaje u laboratoriji (Mirčić, 2013; Matić, 2013; Todorović i sar., 2015, Vlahović i sar., 2016; Gavrilović i sar., 2017; Todorović i sar., 2019; Perić-Mataruga i sar., 2019; Filipović i sar., 2019) sasvim je opravdana studija koja se bavi ekofiziologijom insekata unutar njihovog prirodnog staništa.

S obzirom na porast broja pastrmskih ribnjaka koji se poslednjih godina beleži u Srbiji (videti poglavlje 1.2.) opravdano je istraživanje koje je predmet ove disertacije.

Poznato je da uticaj ribnjaka na vodenu sredinu zavisi od proizvodnog kapaciteta ribnjaka, tipa sistema za prečišćavanje vode, kvaliteta riblje hrane, kao i od hidromorfoloških parametara same tekućice (količina vode u recipijentu, proticaj, brzina toka (Živić i sar., 2009; Radojević i sar., 2019). Kako bi se pratio negativan uticaj pastrmskih ribnjaka, potrebno je sprovoditi monitoring, koji će nam dati informacije o stanju tekućica na kojima se ribnjaci nalaze (Radojević i sar., 2019). Takođe, neophodna je i zaštita vodenih ekosistema od negativnog uticaja pastrmskih ribnjaka kroz zakonske regulative, koje u zemljama u razvoju predstavljaju sve veći problem s obzirom da su ove regulative neadekvatne ili uopšte ne postoje (Živić i sar., 2009).

5.1. RAZNOVRSNOST ZAJEDNICA MAKROINVERTEBRATA REKE SKRAPEŽ

Istraživanja faune zoobentosa kopnenih voda u Srbiji traju skoro jedan vek (Stanković, 1924, 1928) i sa različitim intenzitetom traju do danas o čemu svedoči veliki broj publikovanih radova, koje govore u prilog tome da je proučavanje zajednica makroinvertebrata bitan aspekt svih hidrobioloških istraživanja (sumarni prikaz dat u Živić, 2005 i Stojanović, 2017).

S obzirom na to da makroinvertebrate igraju bitnu ulogu u mnogim vodenim ekosistemima (Boulton, 2003), a ujedno su i najraznovrsnije slatkovodne zajednice (Živić i sar., 2018), jedan deo istraživanja i ove doktorske teze je posvećen istraživanju diverziteta reke Skrapež. Na ovoj brdsko-planinskoj tekućici zabeleženo je ukupno 82 taksona, koji spadaju u različite taksonomske grupe (Plathyhelminthes, Mollusca, Annelida, Crustacea, Insecta: Odonata, Ephemeroptera, Plecoptera, Coleoptera, Megaloptera, Diptera, Trichoptera). U odnosu na do sada istraživane reke Zapadne Srbije, u reci Skrapež zabeležen je niži diverzitet zajednica makrozobentosa u odnosu na reke: Rasina -190 taksona, Rača -177 taksona, Raška -107 taksona, Trešnjica - 129 taksona, (Stojanović, 2017), Toplica - 154 taksona (Živić, 2005) , Kolubara - 114 taksona (Marković i sar., 1999), Đetinja - 112 taksona (Marković. 1995) i Obnica - 104 taksona (Marković i sar., 1997).

Na reci Skrapež, najveći diverzitet imaju vodeni insekti, što je u saglasnosti sa

rezultatima iz prethodnih istraživanja (Živić, 2005; Stojanović, 2017). Najraznovrsnija grupa u okviru klase Insecta je red Diptera sa ukupno 23 taksona, pri čemu su najbrojnije larve iz familije Chironomidae. Slede redovi Ephemeroptera i Trichoptera (18 odnosno 17 identifikovanih taksona), dok je red Plecoptera zastupljen sa samo 2 taksona. S obzirom na to da je ovo najosetljiviji red vodenih insekata, to može biti pokazatelj potencijalnog zagađenja na reci Skrapež, na lokalitetima koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem. Od ostalih grupa insekata, red Coleoptera je zastupljen sa 10, a redovi Odonata i Megaloptera sa po jednim identifikovanim taksonom.

5.2. UPOREDNA ANALIZA SISTEMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE LARVI *E. DANICA* I FIZIČKIH I HEMIJSKIH PARAMETARA VODE

Enzimi SOD, GPx, kao i količina ukupnog glutationa (GSH), kod larvi *E. danica* kao model organizmu (koja je predmet istraživanja ove disertacije), predstavljaju pouzdane biomarkere u proceni ranog odgovora vodenih organizama na organsko zagađenje, što pruža veliki doprinos na polju ekofiziologije akvatičnih organizama (Hook i sar., 2014). To je i bio razlog što smo pratili promene koncentracije pomenutih enzima u larvama *E. danica* tokom različitih sezona, a pod uticajem ispusnih voda u reci Skrapež.

Jedan od glavnih izvora zagađenja brdsko-planinskih tekućica, na kojima se grade pastrmski ribnjaci, je ispuštanje korišćenih voda na ribnjaku koje sadrže ostatke nepojedene riblje hrane i ekskremenata (Liao, 1970; Kronvang i sar., 1993; Iversen, 1995), a što za posledicu ima i promenu hemijskih parametara recipijenta (Boaventura i sar., 1997; Bartoli i sar., 2007), kao što je povećanje koncentracije ukupnog fosfora, fosfata, amonijaka, nitrata i nitrita, kao i pad koncentracije kiseonika. Promene hemijskih činilaca, bez obzira da li se radi o povećanju ili smanjenju njihovih koncentracija, dovode do pogoršavanja kvaliteta vode, i posledično do oksidativnog stresa kod vodenih organizama (Boaventura i sar., 1997; Livingstone, 2001, 2003). U uslovima poremećenog hemizma vode koji ima prooksidativni efekat na larve *E. danica*, enzim superoksid dismutaza (SOD) predstavlja prvu liniju odbrane od reaktivnih kiseoničnih vrsta i ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja. Ovaj enzim prevodi visoko reaktivni superoksid anjon

radikal u manje reaktivnu vrstu kiseonika, vodonik peroksid i molekularni kiseonik (Alscher i sar., 2002; Zelko i sar., 2002; Bafana i sar., 2011). Kada je reč o aktivnosti SOD u našim istraživanjima, CIA analiza pokazuje da se tokom sezona istraživanja na F1 osi (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 16), na negativnom kraju nalazi enzim SOD pošto je njegova aktivnost u proleće i leto značajno veća od aktivnosti u jesen i zimu. Abiotički faktori koji su grupisani na negativnom kraju F1 ose su t_w i N_t , dok nešto slabiju vezu sa negativnim krajem F1 ose ostvaruje P_t (dostižu maksimum u proleće ili leto, a minimum u jesen ili zimu, videti poglavlje 4. 2.1. Slika 16), a DO sa pozitivnim krajem F1 ose i kod njega je situacija obrnuta (dostiže maksimum u zimu, a minimum u proleće). Korelaciona analiza potvrđuje da SOD karakteriše značajna korelacija sa DO, N_t i t_w ($R=0,834$, $P<0,001$), a uočene su i značajne razlike u aktivnosti SOD tokom sezona, ali ne i između lokaliteta (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 15A).

Na kontrolnom lokalitetu, kao i na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka, dolazi do opadanja aktivnosti SOD od proleća do zime (videti poglavlje 4. 2.1. slika 15A). S obzirom na to da je aktivnost SOD u značajnoj korelaciji sa temperaturom, povećanu aktivnost ovog enzima u proleće i leto, u odnosu na jesen i zimu, možemo objasniti kao posledicu povišene temperature u ovim sezonama (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 14), koje su i uslov za obavljanje veoma zahtevnih fizioloških promena vezanih za reprodukciju, a koje su takođe intenzivne u istim periodima godine. Smanjena aktivnost ovog enzima u zimu, prema nekim istraživačima može biti povezana sa fiziološkim statusom organizama i njihovim promenama u metabolizmu (Viarengo i sar., 1990; Regoli, 1998; Livingstone, 2001). Porast temperature uzrokuje intenziviranje metabolizma, te se povećavaju i aktivnosti antioksidativnih enzima. Aktivnost SOD se povećava i u uslovima neznatnog porasta temperature (Buchner i sar., 1996). Kod vrste *Saccostrea cucullata* uočena je varijabilnost aktivnosti SOD u odnosu na sezonu kada je u leto zabeležena najveća aktivnost ovog enzima (Niyogi i sar., 2001). I kod puža *Nacella concinna* je aktivnost SOD veća u toplijem, letnjem periodu, u odnosu na zimsku sezonu (Abele i sar., 1998). Nasuprot tome, kod školjki *Pyganodon grandis* i *P. fragilis* aktivnost SOD je nezavisna od temperature (Doucet-Beaupré i sar., 2010).

Aktivnost SOD je u proleće veća na kontrolnom lokalitetu (SK1) u odnosu na lokalitet neposredno ispod ribnjaka – SK2 (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 15A). Slične rezultate su dobili i Vranković i sar., (2012) koji su uočili da je najveća aktivnost ovog enzima kod vrste *Holandriana holandrii* bila upravo na kontrolnom lokalitetu, koji kao i u našem istraživanju, nije imao uočljivih izvora zagađenja. Razlog za to može biti činjenica da usled intenziviranja fizioloških procesa u optimalnoj sredini u odnosu na zagađenu, dolazi do povećane produkcije superoksida, a samim tim i do intenzivnijeg odgovora SOD (Vranković i sar., 2012). Na aktivnost SOD u larvama *E. danica* poreklom iz reke Skrapež, snažan uticaj ima promena faktora unutrašnje i spoljašnje sredine uslovljena smenom godišnjih doba, pošto su u odnosu na amplitudu aktivnosti i koncentracije, kao i na obrazac njihovih sezonskih promena lokaliteti nizvodno od ispusta ribnjaka veoma slični kontrolnom lokalitetu. Izuzetak je jesenja sezona, kada aktivnost SOD dostiže maksimum na lokalitetu SK2 (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 15A). Ove promene najverovatnije nastaju kao posledica minimalnog protoka i brzine vode u Skrapežu u jesenjoj sezoni (0,10 m³/s i 0,23 m/s), što zajedno sa održavanjem konstantnog protoka vode kroz ribnjak dovodi do maksimiziranja uticaja ispusnih voda ribnjaka na prijemni vodotok. Pomenuti parametri su svakako najvažniji hidrološki faktori koji diktiraju intenzitet uticaja ribnjaka u smislu intenziviranja stresa. Imajući u vidu činjenicu da je SOD snažno korelisana sa koncentracijom kiseonika (DO), maksimalna aktivnost ovog enzima u jesen na lokalitetu SK2 može biti i posledica koncentracije kiseonika koja upravo u jesen na ovom lokalitetu ima najnižu vrednost (8,06 mg/l, Slika 14C- videti poglavlje 4. 2.1.). Da otpadne vode ribnjaka imaju najveći uticaj na lokalitete koji su nizvodno, a koji se odlikuju smanjenom koncentracijom kiseonika, pokazano je i tokom ispitivanja uticaja ribnjaka na aktivnost SOD kod vrste *Dinocras megacephala* (Mirčić i sar., 2016). Smanjena koncentracija kiseonika na lokalitetima ispod ribnjaka je zabeležena i u drugim studijama (Selong i Helfrich, 1998; Pulatsu i sar., 2004; Živić i sar., 2009; Silva i sar., 2012). U slučaju ovog parametra, konstatovan je brz oporavak, jer je ponovni porast u njegovoj koncentraciji zabeležen na lokalitetima SK3 i SK4 (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 14C), a ovako brz oporavak je posledica stabilne brzine toka reke Skrapež.

Promene u nivou aktivnosti određenog enzima antioksidativne odbrane mogu biti kompenzovane promenom u nivou aktivnosti nekog drugog enzima koji ima sličnu funkciju. Primer za to je smanjenje nivoa aktivnosti katalaze, koja može biti kompenzovana povećanjem nivoa aktivnosti glutathion peroksidaze. (Bagnjukova i sar., 2005) što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Naime, aktivnost CAT kod *E. danica* je bila ispod granice detekcije, što može biti posledica postojanja male koncentracije vodonik peroksida, usled čega se aktivira glutathion peroksidaza koja ima veoma važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama ove reaktivne kiseonične vrste (Kruidenier i Verspaget, 2002; Matović i sar., 2004). Odsustvo aktivnosti CAT je neočekivano, s obzirom na to da su kod vodenih organizama, posebno beskičmenjaka, zabeležene značajne promene u aktivnosti CAT pod uticajem različitih polutanata (Livingstone i sar., 1989; Livingstone, 2001). Međutim, to se može objasniti činjenicom da se usled intezivnijeg zagađenja, resursi antioksidativne zaštite mogu iscrpeti, tako da se i nivo aktivnosti antioksidativnih enzima pod tim uticajem smanjuje (Regoli i Principato, 1995; Canesi i sar., 1999). Tako superoksid anjon radikal može da inhibira katalazu pri čemu se gubi aktivnost ovog enzima (Stadtman i sar., 1991). Prema Regoli i Principato (1995), smanjena aktivnosti CAT može se smatrati odgovorom na akutno zagađenje. Kod vrste *Macoma balthica* nakon izlaganja zagađivačima uočen je pad aktivnosti katalaze (Regoli i sar., 1998). Manje promene u aktivnosti CAT kod vrste *Gammarus locusta* u odnosu na GPx čija je aktivnost bila povećana uočili su Correia i sar., (2003). U našem istraživanju, na lokalitetima ispod ribnjaka, aktivnost GPx je bila povećana, a CAT nije detektovana. Ovo se može objasniti činjenicom da enzimi katalaza i glutathion peroksidaza imaju u suštini slične uloge u uklanjanju vodonik peroksida (Halliwell i Guteridge, 1999; Kruidenier i Verspaget, 2002).

Kada je reč o aktivnosti GPx, naši rezultati ukazuju da je karakteriše značajnija longitudinalna nego sezonska varijabilnost tako da je ona blisko povezana sa F2 osom (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 16) – osom longitudinalnih promena, i to sa njenim negativnim krajem pošto se maksimum aktivnosti u svim sezonama u odnosu na kontrolni SK1 lokalitet, dostiže na lokalitetu SK2 (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 15B). Na lokalitetu SK3 u svim sezonama, sem u jesen, dolazi do oporavka enzima i to najverovatnije zbog

samoprečišćavajuće moći reke Skrapež (Simić i Simić, 2009). Uočena je i izrazita sezonska promena u aktivnosti GPx, koja za sve sezone dostiže maksimum aktivnosti na SK2, ali se na ovom lokalitetu uočava i izrazit pad aktivnosti GPx u leto i potom postepeni, ali nepotpuni oporavak do zime (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 15B). Aktivnost glutation peroksidaze je najmanja u leto i kod školjki *Tapes philippinarum* i *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti i sar., 2008). Gabryelak i sar., (1983) su pokazali da je kod riba *Tinca tinca*, *Carassius carassius* i *Cyprinus carpio* aktivnost peroksidaza veća u proleće nego u jesen.

Analizirajući abiotičke parametre, uočili smo da su sa negativnim krajem F2 ose najčvršće povezani v, NO_3^- , NH_4^+ i P_t , a sa pozitivnim krajem DO % (videti poglavlje 4. 2.1. Slika 16). U odnosu na kontrolni, SK1 lokalitet, na lokalitetu SK2 dolazi do značajnog smanjenja DO %, uz istovremeni porast v, NO_3^- , NH_4^+ i P_t). Ova promena je posledica uliva otpadne vode iz ribnjaka i predstavlja izvor stresa koji je doveo do povećanja aktivnosti glutation peroksidaze na lokalitetu nizvodno od samog ribnjaka. Indukcija aktivnosti GPx kod organizama izloženih različitim polutantima pokazana je i u drugim studijama. Povećanje aktivnosti ovog enzima kod *Austrocochlea porcata* ukazuje da prooksidansi iz nafte izazivaju oksidativni stres kod ove vrste (Reid i MacFarlane, 2003). Toksične materije utiču na povećanje aktivnosti ovog enzima i kod riba (Li i sar., 2003b; Puerto i sar., 2009).

Kao posledica uliva otpadnih voda ribnjaka koje imaju povećanu koncentraciju nitrata, mogu nastati hipoksični uslovi, sa štetnim dejstvom na organizme, koje se ispoljava kroz oksidativni stres (Camargo i sar., 2005). Upravo se na lokalitetu SK2 povećava koncentracija azotnih jedinjenja i fosfora, a javlja se i eutrofikacija koja se znatno ubrzava dospevanjem neiskorišćene riblje hrane, jer se samo njen mali procenat zadržava kao biomasa riba, a ostatak se ispušta otpadnim vodama u recipijent (Kendra, 1991; Boaventura i sar., 1997; Fornshell, 2001; Briand i sar., 2003). Zbog toga je i aktivnost glutation peroksidaze snažno korelisana sa koncentracijom NO_3^- ($R = 0,853$; $P < 0,001$, videti poglavlje 4. 2.1. Slika 17A). Idući nizvodno od ribnjaka, menja se i koncentracija nitrita, pa je na SK2 u odnosu na kontrolni lokalitet ona povećana, i najveću vrednost dostiže u proleće (0,009 mg/l). Na lokalitetu SK2 je uočena i povećana koncentracije

ukupnog fosfora (0,07 mg/l), što je u skladu sa istraživanjima drugih autora koji su uočili porast koncentracija kako ukupnog fosfora, tako i azotnih jedinjenja nizvodno od ribnjaka (Foy i Rosell, 1991; Boaventura i sar., 1997; Pulatsu i sar., 2004; Bartoli i sar., 2007; Živić i sar., 2009; Camargo i sar., 2011).

Naši rezultati pokazuju da ukupnu količinu glutaciona (GSH) u larvama *E. danica* iz reke Skrapež karakteriše veća sezonska nego longitudinalna varijabilnost (videti poglavlje 4.2.1. Slika 15C), kao i da se na različitim lokalitetima GSH menja na isti način kao i SOD. Ukupni glutacion u proleće dostiže maksimum na kontrolnom lokalitetu, a u jesen na SK2. U letnjem i zimskom periodu GSH karakteriše statistički značajan minimum na SK2 (videti poglavlje 4.2.1. Slika 15C). Smanjenje GSH na lokalitetu SK2 se može objasniti povećanjem aktivnosti glutaciona peroksidaze, jer je poznato da enzimi koji koriste GSH kao kofaktor (GPx,) dovode do trošenja redukovane forme glutaciona prevodeći ga u oksidovani oblik (Birben i sar., 2012). Da je smanjena koncentracija GSH u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem GPx, pokazano je i u drugim studijama (Kruidenier i Verspaget, 2002; Despotović i sar., 2012). Birben i sar., (2012) ukazuju na činjenicu da se količina GSH može smanjivati, uz istovremeno akumuliranje oksidovane forme, a sve to kao posledica prisustva toksičnih jedinjenja i postojanja oksidativnog stresa. Važna uloga glutaciona je i u reparaciji oštećenja DNK molekula zbog oksidativnog stresa, uklanjanju slobodnih radikala, omogućavanju regeneracije neenzimskih antioksidanasa do aktivnih formi, a može da spreči apoptozu koju mogu da izazovu ROS (Kruidenier i Verspaget, 2002). Da je promena aktivnosti GSH u velikoj meri pod uticajem sezonskih promena, pokazano je kod puža *Viviparus acerosus* kod kojeg značajno opada od leta do jeseni (Despotović i sar., 2012). Takođe, kod vrste *Fulvia fragilis*, nivo glutaciona je veći u leto nego u zimu (Mahmoud i sar., 2010).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da pastrmski ribnjaci sa kojih se voda izliva u recipijente, izazivaju stres kod akvatičnih organizama što se reflektuje, između ostalog i kroz izmenjenu aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Vrsta *E. danica* na kojoj su i obavljena ova istraživanja reaguje na promene u okruženju, te se pokazala kao dobar bioindikator zagađenja voda koje naseljava.

5.3. ANALIZA KONCENTRACIJA TEŠKIH METALA U SEDIMENTU I TELU LARVE *E. DANICA*

Određivanje ukupne koncentracije metala u sedimentu i vodi ne daje tačnu procenu njegovog uticaja na životnu sredinu i zbog toga je potrebno pratiti koliko se koji element akumulira u organizmima, tj. koliko su oni biodostupni. Vodeni beskičmenjaci usvajaju metale i akumuliraju ih u svojim telima, a to dalje, preko lanaca ishrane utiče na sve potrošače uključujući i čoveka. S jedne strane to može imati dugoročne posledice na ljudsko zdravlje (Notten i sar., 2005; Fernandes i sar., 2007; Corbi i sar., 2008; Agah i sar., 2009), dok s druge može dovesti i do zagađenja vodenih ekosistema (Malik i sar., 2010). Da bi se više razumeo uticaj pastrmskog ribnjaka na akumulaciju teških metala kod vodenih beskičmenjaka, izvršili smo istraživanje kod larve *E. danica*, kao model organizma.

Osnovna odlika sedimenta na reci Skrapež je veoma visoka koncentracija Cr i Ni. Stepent kontaminacije pokazuje da su koncentracije ovih elementa četiri (Cr) i sedam puta (Ni) veće od njihovih koncentracija u kontinentalnim škrljicima (videti poglavlje 4.4.1. Slika 19). U odnosu na publikovane referentne vrednosti za kvalitet sedimenta slatkovodnih ekosistema (MacDonald i sar., 2000), najniža registrovana koncentracija, u sedimentu Skrapeža, Ni je 7,4, a Cr 2,45 puta veća od PEC (probable effect concentration; 48,6 mg/kg, odnosno 111 mg/kg). Do sličnog zaključka se može doći i ako se uporede koncentracije ova dva metala sa maksimalno dozvoljenim koncentracijama u sedimentu, MDK (Službeni glasnik, br. 50/2012), gde njihove vrednosti značajno prelaze te koncentracije (MDK za nikel iznosi 44 mg/kg, a za hrom 240 mg/kg). Hrom je retko prisutan u prirodnim vodama (Mertz, 1986), ali u njih može dospeti kao zagađivač iz različitih ljudskih aktivnosti i deponujući se u sedimentu. Ponekad se koristi kao mikronutrijent u đubrivima za uzgoj različitih žitarica. U zemljištu, koncentracija hroma zavisi od tipa poljoprivredne aktivnosti (Santos i sar., 2009). S obzirom na to da je dolina reke Skrapež pod poljoprivrednim kulturama, negde je i očekivano da se u sedimentu zabeleže veće koncentracije hroma. Na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka-SK2, vrednosti hroma su veće nego na ostalim lokalitetima. Na tom lokalitetu ima više organske

supstance nego na drugim lokalitetima, a sadržaj organske materije ima presudan uticaj na vezivanje hroma u tlu, što je u svojim istraživanjima pokazao Santos i sar. (2009). Nikl u sedimentu je najverovatnije geohemijskog porekla, pa se njegova povećana koncentracije u sedimentu iz reke Skrapež može objasniti činjenicom da su u slivu ove reke prisutne magmatske i metamorfne stene, kao i škriljci u kojima se koncentriše nikl (Cannon i sar., 1978; Kovačević-Majkić, 2009). Takođe, na planini Povlen, na kojoj izvire reka Skrapež, postoji i ležište nikla (Kovačević-Majkić, 2009) što može biti dodatni uzrok njegove visoke koncentracije. Kao i u slučaju Cr, na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka dolazi do povećanja koncentracije Ni, što je verovatno posledica njegove povećane koncentracije u ispusnim vodama. Naime, primena hemijskih sredstava u poljoprivrednim procesima može dovesti do toga da se u sirovinama biljnog porekla koje se koriste u proizvodnji hrane za ribe, nađu i ostaci teških metala, pa i nikla koji ima sposobnost nakupljanja u semenima i plodovima biljaka, a odlikuje ga i dobra pokretljivost u biljnim tkivima (Schlechtriem, 2015). Takođe, u proizvodnji riblje hrane koriste se različite namirnice koje sadrže nikl, kao što su kukuruz, stočni grašak, soja (Stanković, 2013).

Najviše koncentracije ostalih metala u sedimentu iz reke Skrapež su niže od njihovih TEC vrednosti (threshold effect concentration; MacDonald i sar., 2000). To je posebno izraženo u slučaju As i Cd čiji je i faktor kontaminacije najniži, a čije su najviše registrovane koncentracije 9, odnosno 10 puta niže od TEC (9,79 mg/kg, odnosno 0,99 mg/kg). I prema Službenom glasniku br. 50/2012, koncentracije svih metala, sa izuzetkom Ni i Cr, su daleko manje od maksimalno dozvoljenih koncentracija u sedimentu površinskih voda.

Na lokalitetu SK2, koji se nalazi neposredno ispod ribnjaka, koncentracije Cr_s, Cd_s, Cu_s, Fe_s, Ni_s i Pb_s dostižu značajan maksimum, uz veoma malo sezonsko variranje (videti poglavlje 4.4.1. slike 18, 19), što može biti posledica ispuštanja vode sa ribnjaka u reku Skrapež. Naime, efluenti iz ribnjaka koji se ispuštaju u recipijent sadrže ostatke riblje hrane i fekalija (Kronvang i sar., 1993; Iversen, 1995), što utiče na promenu hemijskih parametara samog recipijenta (Boaventura i sar., 1997; Bartoli i sar., 2007). Na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka dolazi do povećanja koncentracije nitrita i nitrata, sulfata, fosfata, kao i do smanjenja koncentracije kiseonika, što pospešuje brzinu eutrofikacije, s

obzirom na to da sediment biva obogaćen organskom materijom koja za sebe vezuje metale (Burridge i sar., 2010). Na taj način, zbog promene uslova sredine, sedimenti postaju izvor metala (Izquierdo i sar., 1997; Zoumis i sar., 2001; Morillo i sar., 2002), koji postaju više dostupni za vodene beskičmenjake, pogotovo za one grupe koje su ili načinom života ili kroz ishranu vezane za sediment. Povećanje koncentracije biogenih metala poput Cu i Fe na lokalitetima ispod ribnjaka može biti posledica i njihovog prisustva u ribljem brašnu, koje je bogato mikroelementima u koje spadaju i gvožđe i bakar, a čiji nepojedeni ostaci kroz ispusne vode dospevaju u prijemni vodotok i nagomilavaju se u sedimentu neposredno ispod mesta ispusta (Miller i sar., 1993; Kamunde i sar., 2002). Zagađenje vodenog ekosistema bakrom može nastati i ciljano. Naime, usled upotrebe herbicida i pesticida, soli bakra se mogu naći u vodenoj sredini, a samim tim i akumulirati u sedimentu (Flemming i Trevors, 1989; de Oliveira-Filho i sar., 2004).

Analiza koinercije i ANOVA su pokazale da koncentracije hroma, bakra, gvožđa i olova (C_{rE} , C_{uE} , Fe_E , Pb_E) u larvama *E. danica* dostižu statistički značajan maksimum na lokalitetu SK2 i pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju sa koncentracijama istih metala u sedimentu (videti poglavlje 4.4.1. Slika 20A, C). Nasuprot njima, koncentracija kadmijuma u larvama, Cd_E , dostiže minimum na istom lokalitetu, ali je negativno korelisan sa koncentracijom ovog teškog metala u sedimentu, Cd_s (videti poglavlje 4.4.1., Slika 20B). Literaturni podaci o odnosu koncentracija teških metala u sedimentu i vodenim beskičmenjacima su prilično neujednačeni. Tako su Harrahy i Clements (1997), ispitujući toksičnost i bioakumulaciju različitih metala kod *Chironomus tentans*, uočili značajno povećanje koncentracije Cd, Zn i Pb, ali ne i Cu, u njihovom telu, što je bilo u korelaciji sa porastom koncentracije ovih metala i u sedimentu. U rekama koje primaju organsko zagađenje, koncentracija bakra kod *Erpobdella octoculata* i *Asellus aquaticus* se smanjuje sa povećanjem koncentracije u sedimentu, dok se olovo povećava (Eyres i Pugh-Thomas, 1978). S druge strane, Goodyear i McNeill (1999) navode da je kod svih beskičmenjaka telesna koncentraciju bakra u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ovog metala u sedimentu. Tako su Hare i sar., (1991) uočili proporcionalnost koncentracije Cu i Pb u telu *Hexagenia* sa onima u sedimentu. Što se tiče drugih metala, Corbi i sar., (2010) navode da je gvožđe bioakumulirano u insektima u korelaciji sa koncentracijama u

sedimentu. Jop (1991) je pratio biokoncentraciju kadmijuma kod *Ephemera danica*, *E. vulgata*, *Leptophlebia vespertina* i *Baetis vernus* i nasuprot našim istraživanjima došao do zaključka da je koncentracija kadmijuma proporcionalna koncentracijama u sedimentu. Nasuprot tome, Corbi i sar., (2010) nisu registrovali Cd u larvama insekata, iako je ovaj teški metal bio prisutan u sedimentu.

5.4 BIOTA-SEDIMENT FAKTOR AKUMULACIJE–BSAF

Svi vodeni beskičmenjaci usvajaju metale iz svoje okoline, a koncentracija metala koja će se naći u njihovom telu zavisi kako od vrste beskičmenjaka, tako i od relativnih bioloških mogućnosti metala (Rainbow i Wang, 2001). Faktori koji utiču na sudbinu metala su fiziologija beskičmenjaka, a veoma je važno i da li se metal koristi za esencijalnu metaboličku funkciju ili se izlučuje ili skladišti u telu ili pak dobija pristup “pogrešnom” biomolekulu i stoga ima toksičan efekat (Rainbow, 2002). Naše istraživanje je pokazalo da metali koje prema faktoru kontaminacije karakteriše velika koncentracija u sedimentu (Ni, Cr, Fe i Mn), odlikuje BSAF manji od jedinice, što podrazumeva i odsustvo njihove bioakumulacije u larvama *E. danica*. S druge strane elemente koji imaju nisku koncentraciju u sedimentu (As, Cd i Cu), karakteriše BSAF veći od jedinice, odnosno uočena bioakumulacija u larvama *E. danica*. Međutim, ukoliko se posmatra odnos koncentracija ovih elemenata u sedimentu i njihov BSAF, u okviru ove dve grupe mogu se uočiti dalje distinkcije, pa Fe i Cu karakteriše pozitivna korelacija ove dve vrednosti, a Cr, As i Cd negativna. Uz to, Cu_B i Fe_B dostižu značajan maksimum na lokalitetu SK2 (videti poglavlje 4.4.1. Slika 19D, E). Koncentracija Pb u sedimentu je relativno niska, ali ga karakteriše BSAF čija je vrednost oko 1. U slučaju Ni i Cr koji su toksični za živa bića (Poulton i sar., 1989; Eisler, 1998; Kotaš i Stasicka, 2000), a u sedimentu su prisutni u izuzetno velikim koncentracijama, ovakav rezultat je očekivan i verovatno predstavlja odbrambeni mehanizam *E. danica* protiv usvajanja ovih toksičnih metala u visokim koncentracijama koje su letalne za ove larve. To potvrđuje i pomenuta negativna korelacija između Cr_E i Cr_S (videti poglavlje 4.4.1. Slika 20A). Za razliku od drugih metala, nikl i hrom su najmanje mobilni, pa su i manje dostupni organizmima faune dna i imaju manje

šanse da uđu u lanac ishrane (Leonard i Wood, 2013). Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. Naime, Shulkin i sar. (2003) su uočili povećanje koncentracije svih metala, izuzev Ni, u telu školjke *Crenomitilus grayanus*. Takođe, De Jonge i sar., (2014) navode da opterećenja tela kod *Leuctra sp.*, *Rhithrogena sp.*, Simuliidae i Perlodidae nisu povezana sa nivom ukupnog Ni. Kod *Daphnia magna*, ingestovani nikel ili se ne inkorporira ili se brzo eliminiše (Watras i sar., 1985). Muysen i sar., (2004) su došli do zaključka da je BSAF za Ni skoro uvek manji od jedan, tj. da je koncentracija nikla kod bentosnih organizama niža od koncentracije ovog metala u sedimentu. Što se tiče hroma, Hamidian i sar., (2016) su uočili da kod hironomida u Shoor river (Iran) dolazi do male bioakumulacije ovog metala, ali su njegove koncentracije u sedimentu bile 5-10 puta manje nego u reci Skrapež što je takođe uočeno i u našim istraživanjima. Sve ovo nas upućuje na zaključak da vodeni beskičmenjaci najverovatnije razvijaju mehanizme odbrane od ovog toksičnog metala, i da što ga više ima u sedimentu to ga bentosni organizmi manje usvajaju.

Pozitivna korelacija između akumulacija bakra i gvožđa u sedimentu i larvama *E. danica* se može objasniti činjenicom da su ovi metali esencijalni i neophodni za metaboličku aktivnost organizma (Cohen i sar., 2001). Kao što je već rečeno, Goodyear i McNeill (1999) su u svojoj studiji našli pozitivnu korelaciju između koncentracije bakra ispitivanih vodenih beskičmenjaka i koncentracije u sedimentu. Došli su do zaključka i da se koncentracija bakra kod organizama srazmerno povećava kako se povećava njegova koncentracija u sedimentu, bez znakova biološkog ograničenja. Ove rezultate potvrđuje i Gundacker (2000), koji je upoređujući koncentraciju metala u sedimentu i u telu mekušaca došao do saznanja da je došlo do bioakumulacije bakra, ali ne i olova u telu ovih organizama. Slična je situacija i sa Fe. Naime, Corbi i sar., (2010) su uočili da su koncentracije gvožđa u sedimentu, iako visoke, u pozitivnoj korelaciji sa akumulacijom u insektima, posebno u vrstama roda *Chironomus*.

Kada je u pitanju bioakumulacija Cd i As, rezultati našeg istraživanja imaju za rezultat negativnu korelaciju ovih elementa u sedimentu i larvama *E. danica*. Naime, iako je nivo bioakumulacije Cd i posebno As veoma visok, njena vrednost za oba elementa opada sa porastom njihove koncentracije u sedimentu. Imajući u vidu da su u pitanju

izuzetno toksični elementi, ova negativna korelacija najverovatnije predstavlja odbrambeni mehanizam *E. danica* protiv njihove preterane akumulacije. U slučaju bioakumulacije Cd, naše rezultate potvrđuju istraživanja Girgin i sar., (2010) u kojima je pokazano da vrste iz reda Ephemeroptera akumulira veću koncentraciju kadmijuma od nekih drugih redova vodenih beskičmenjaka. I Gundacker (2000) ukazuje na značajan nivo bioakumulacije Cd kod mekušaca. S druge strane, istraživanja bioakumulacije teških metala u hironomidama u Shoor river (Iran) su pokazala da u slučaju As i Cd bioakumulacija izostaje (Hamidian i sar., 2016).

5.5 ANALIZA KONCENTRACIJA TEŠKIH METALA U VODI U ODNOSU NA KONCENTRACIJE U TELU *E. DANICA*

Naše analize jednoznačno ukazuju na činjenicu da ne postoji značajan uticaj koncentracije istraživanih metala u vodi na njihovu koncentraciju kod larvi *E. danica*. Odsustvo uticaja može biti posledica načina života ovog organizma. Naime, larve ove vrste se ubušuju u supstrat praveći tunele, a hrane se tako što filtriraju organski detritus (Clements i Kiffney, 1994), pa je i očekivano postojanje pozitivne korelacije koncentracije metala u sedimentu sa onima u njihovom telu, ali ne i sa koncentracijom metala u vodi. U suprotnosti sa našim rezultatima, Brown (1977a) je u reci zagađenoj otpadnim materijama iz napuštenog rudnika, primetio značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije bakra u telu larvi Trichoptera, s jedne strane, i u vodi, s druge strane. Korelacija u koncentracijama nekih metala u organizmima i vodi koju nastanjuju, zabeležena je i kod *Ecdyonurus venosus*, *Brachyptera risi*, *Leuctra spp.*, *Perla bipunctata*, *Rhyacophila dorsalis* i *Dicranota sp.* (Burrows i Whitton, 1983). Bervoets i sar., (1997) ukazuju da je koncentracija olova i kadmijuma u korelaciji sa ukupnom koncentracijom olova u sedimentu, ali ne i u čistoj vodi.

5.6. ANALIZA METRIČKIH OSOBINA ZAJEDNICE NA ISTRAŽIVANOJ TEKUĆICI

Posmatrajući celokupnu zajednicu makroinvertebrata na reci Skrapež, diverzitet vrsta opada na lokalitetu ispod ribnjaka (SK2), što je pokazano u slučaju i Šenonovog i Simpsonovog indeksa diverziteta. U tom slučaju, može se potvrditi da su indeksi diverziteta osetljivi na uticaj pastrmskih ribnjaka kada je u pitanju zajednica makrozoobentosa gornjeg toka reke Skrapež. Međutim, zabeležen je i drugačiji trend kada su u pitanju indeksi diverziteta, tj. može se uočiti značajan porast diverziteta na lokalitetima neposredno ispod pastrmskih ribnjaka (Stojanović, 2017). U svom istraživanju, Guilpart i sar., (2012) su pokazali da pod uticajem otpadnih voda pastrmskih ribnjaka ne dolazi do promena ukupnog diverziteta vrsta, već samo do smene dominantnih organizama. Za ukupni diverzitet, kao i za samo tumačenje rezultata, jako je bitna identifikacija svih taksona do nivoa vrste, jer se na taj način izbegava pogrešna interpretacija kada se govori o rezultatima indeksa diverziteta (Stojanović, 2017). Kako indeksi diverziteta ne razdvajaju taksone prema osetljivosti na sredinski stres, kao i činjenicu da je diverzitet veoma varijabilan i zavisi od velikog broja činioca, u svetu i kod nas on se ne koristi samostalno u biomonitoringu kopnenih voda već samo kao jedna od parametara za ocenu stepena antropogenog pritiska (Knoben i sar., 1995; Živić i sar., 2018) i prednost se daje drugim indeksima (Hughes, 1978; Hawkes, 1979), kao što je saprobnostni indeks po Zelinki i Marvanu. Prema ovom indeksu, kvalitet vode nizvodno od pastrmskog ribnjaka na reci Skrapež se pogoršava, što je u svojim istraživanjima potvrdila i Stojanović (2017). Dobijeni rezultati su potpuno očekivani, s obzirom na to da indeks saprobnosti meri nivo koncentracije rastvorenog kiseonika i organskog zagađenja, a iz naših rezultata se može videti da na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka dolazi do značajnog pada koncentracije kiseonika, a povećanja organskog zagađenja, što je posledica direktnog uticaja pastrmskog ribnjaka.

Rezultati dobijeni primenom BMWP indeksa u saglasnosti su sa rezultatima nekih ranijih istraživanja (Camargo, 1992a, Camargo i Gonzalo, 2007, Hatami i sar., 2011). Na osnovu BMWP indeksa, pastrmski ribnjak nema značajan uticaj na kvalitet vode reke Skrapež. Šta više, kvalitet vode na lokalitetu neposredno ispod ribnjaka je bolji u odnosu

na druge lokalitete. Primena ovog biotičkog indeksa, bez modifikacije za specifično podneblje, često se može pokazati kao vrlo neefikasna i dati rezultate koji se ne podudaraju sa drugim tipovima indeksa (Živić i sar., 2018).

Otpadne vode pastrmskog ribnjaka utiču na smenu funkcionalnih trofičkih grupa na lokalitetima u nekoj tekućici, te analizom trofičke strukture dobijamo uvid u dinamične ekološke procese koji se odvijaju u posmatranom vodenom ekosistemu (Moog, 2002). Kada posmatramo fizičko-hemijske parametare duž rečnog toka, kao i to kako se pod njihovim, ali i uticajem dostupne hrane smenjuju životne zajednice, takav koncept se naziva koncept rečnog kontinuuma (Vannote i sar., 1980). Poremećaji u ravnotežnom stanju reke se odražavaju na raspored funkcionalnih trofičkih grupa (Moog, 2002), tako da se na osnovu njihovog rasporeda i pojavljivanja duž rečnog kontinuuma može zaključiti kakav uticaj na zajednice makroinvertebrata ima zagađenje iz ribnjaka i da li uopšte utiče na njih. Na primer, organske materije kojih usled ispuštanja otpadnih voda ima znatno više na lokalitetima ispod ribnjaka, utiču na to da se one u višku talože upravo na ovim lokalitetima, što rezultira pojavom zajednica kao što su sakupljači, a koje su prilagođene da iskoriste ovaj materijal (Vannote i sar., 1980). Posmatrajući zajednicu sakupljača, aktivnih sakupljača filtratora i pasivnih sakupljača filtratora u reci Skrapež, uočavamo da njihov procenat raste na drugom lokalitetu, što je posledica direktnog uticaja ispusnih voda pastrmskog ribnjaka. Ovakvi rezultati su dobijeni i u mnogim drugim studijama (Camargo, 1992a; Loch i sar., 1996; Guilpart i sar., 2012; Stojanović, 2017). Porast sakupljača na četvrtom lokalitetu ukazuje na činjenicu da je i tu došlo do taloženja organske materije.

Na osnovu koncepta rečnog kontinuuma, u gornjim tokovima reka su najzastupljeniji sekači, što je potvrđeno i u našem istraživanju u kojem su sekači najbrojniji na kontrolnom lokalitetu (SK1). Njihova brojnost opada na lokalitetu ispod ribnjaka, što je u saglasnosti sa drugim istraživanjima i što se može posmatrati kao uticaj ribnjaka (Camargo, 1992a; Živić i sar., 2009a; Guilpart i sar., 2012; Stojanović, 2017), s obzirom na to da su sekači osetljivi na organsko zagađenje. Procenat strugača opada na drugom lokalitetu, što je bilo i očekivano i što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Camargo, 1992a; Loch i sar., 1996; Guilpart i sar., 2012). Camargo (1992a) je u svom istraživanju pokazao da na lokalitetima ispod ribnjaka dolazi do porasta broja predatora,

što je u suprotnosti sa rezultatima našeg istraživanja. Naime, na reci Skrapež predatori su najbrojniji na prvom lokalitetu, da bi idući nizvodno njihova brojnost opadala, tako da zastupljenost predatora nije dobar pokazatelj uticaja ispusnih voda ribnjaka na ovaj vodotok.

6. ZAKLJUČCI

Predmet doktorske disertacije je izučavanje efekta ispusnih voda sa pastrmskog ribnjaka na nivo aktivnosti antioksidativnih enzima kod larve *Ephemera danica* i bioakumulacije teških metala u sedimentu, vodi i telu *E. danica*, a zaključci do kojih se došlo su:

➤ Na istraživanoj tekućici, u svim mesecima istraživanja i na sva četiri istraživana lokaliteta identifikovano je ukupno 82 taksona: 34 do nivoa vrste, 3 do nivoa grupe vrsta, 33 taksona su identifikovana do nivoa roda, 8 taksona do nivoa familije, 3 taksona do nivoa podfamilije i jedna određena klasa.

➤ Najveći udeo unutar zajednica makrozoobentosa su imale larve koje pripadaju različitim redovima insekata. Najraznovrsnija grupa među njima je red Diptera sa 23 taksona, a zatim slede redovi Ephemeroptera sa 18 taksona i Trichoptera sa 17 taksona. Iz reda Coleoptera identifikovano je 10 taksona. Red Plecoptera zastupljen je samo sa 2 taksona, dok redovi Odonata i Megaloptera imaju po 1 identifikovan takson.

➤ Kvantitativnom analizom zajednica makrozoobentosa u reci Skrapež na četiri istraživana lokaliteta u proleće, leto, jesen i zimu procenjeno je da je prosečna brojnost jedinki 7.287 ind/m².

➤ Fizički i hemijski parametri koji se najviše menjaju pod uticajem ispusnih voda pastrmskog ribnjaka i statistički se značajno razlikuju su koncentracija kiseonika, koja se smanjuje između kontrolnog lokaliteta i lokaliteta ispod ribnjaka. Takođe, dolazi i do povećanja koncentracija amonijum jona, nitrata i ukupnog fosfora na lokalitetu SK2 u odnosu na SK1 (kontrolni lokalitet).

➤ Analizom koinercije (CIA) utvrđen je uticaj promena hemijskih i fizičkih parametara vode izazvanih otpadnim vodama pastrmskog ribnjaka na aktivnost SOD i GPx i na količinu ukupnog glutationa u *E. danica*. Rezultati CIA analize pokazali su da postoji statistički vrlo značajna ($P < 0,001$) ko-struktura između korelacijske matrice PCA antioksidativnih enzima i korelacijske matrice PCA fizičkih i hemijskih parametara vode.

➤ Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da aktivnosti SOD i GPx kao i količina GSH statistički značajno variraju kako duž lokaliteta tako i tokom sezona, kao i da između ova dva faktora postoji statistički značajna interakcija, što znači da sezonske promene

imaju značajan uticaj na longitudinalne promene i obratno.

➤ Aktivnost SOD karakteriše veća sezonska nego longitudinalna varijabilnost. Tako postoje statistički značajne razlike u aktivnosti SOD u svim sezonama, ali ne i između lokaliteta. U toku leta i zime razlike između aktivnosti SOD na različitim lokalitetima ne postoje. U proleće aktivnost SOD je veća na kontrolnom lokalitetu (SK1, $32,7 \pm 1,3$ U/mg proteina) koji se nalazi iznad ribnjaka u odnosu na lokalitet neposredno ispod ribnjaka (SK2, $26,7 \pm 0,4$ U/mg proteina), gde dolazi do pada aktivnosti. Najintenzivnije promene karakterišu jesenju sezonu kada aktivnost SOD dostiže statistički značajan maksimum neposredno po ulivu otpadnih voda iz ribnjaka na lokalitetu SK2.

➤ Aktivnost GPx karakteriše značajnija longitudinalna nego sezonska varijabilnost, za razliku od SOD. Što se tiče longitudinalnih promena u svim sezonama dolazi do velikog (2 do 4 puta) i statistički značajnog porasta aktivnosti GPx na SK2 u odnosu na kontrolni lokalitet, što ukazuje da organsko zagađenje poreklom sa ribnjaka indukuje oksidativni stres kod vrste *E. danica*.

➤ Količina ukupnog glutationa (GSH) veoma blisko prati promene aktivnosti SOD i nju karakteriše veća sezonska nego longitudinalna varijabilnost. Količina GSH takođe opada tokom godine (od $11,7 \pm 0,5$ nmol GSH/g tkiva u proleće do $2,8 \pm 0,2$ nmol GSH/g tkiva u jesen). U odnosu na promene duž lokaliteta, količina GSH u proleće dostiže maksimum na kontrolnom lokalitetu ($16,2 \pm 0,5$ nmol GSH/g tkiva), a u jesen na SK2 ($4,1 \pm 0,1$ nmol GSH/g tkiva), što takođe može da se pripiše negativnom uticaju pastrmskog ribnjaka.

➤ Analiza CIA je pokazala postojanje statistički visoko značajne ($P < 0,001$) kostrukture između PCA ko-relacione matrice koncentracija teških metala u sedimentu i PCA korelacione matrice koncentracije teških metala u *E. danica* i BSAF.

➤ Analiza koncentracija metala u sedimentu pokazuje da koncentracije gvožđa (Fe_s), bakra (Cu_s), hroma (Cr_s), nikla (Ni_s), olova (Pb_s) i kadmijuma (Cd_s), statistički značajno rastu na SK2 lokalitetu neposredno ispod ribnjaka u odnosu na kontrolni lokalitet, što se može pripisati direktnom uticaju ribnjaka.

➤ U slučaju koncentracija mangana i arsena u sedimentu (Mn_s , odnosno As_s) nema statistički značajnih razlika između lokaliteta, a As_s je čak nešto manja na SK2 u odnosu na

ostale lokalitete. Ovo je posledica većih sezonskih varijacija u odnosu na longitudinalne na šta ukazuje i CIA analiza.

➤ Analiza koncentracija metala u larvama *Ephemera danica* pokazuje da su koncentracije hroma (Cr_E), bakra (Cu_E), gvožđa (Fe_E) i olova (Pb_E), baš kao i koncentracije ovih metala u sedimentu statistički značajno veće na SK2, u odnosu na sve ostale lokalitete. Utvrđeno je da koncentracije sva četiri metala u *E. danica* pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa koncentracijom odgovarajućeg metala u sedimentu.

➤ Da bi se ispitaio uticaj koncentracija ispitivanih metala u vodi na njihovu koncentraciju i sposobnost akumulacije u *E. danica* analiza CIA je pokazala da ne postoji statistički značajna ko-struktura između PCA korelacione matrice koncentracija teških metala u vodi i PCA korelacione matrice koncentracije teških metala u *E. danica* i BSAF.

➤ Ako se analiziraju vrednosti Faktora kontaminacije sedimenta jasno se uočava da najveći stepen kontaminacije karakteriše Ni_s ($6,7 \pm 0,3$) i Cr_s ($4,2 \pm 0,3$).

➤ Indeks saprobnosti po Zelinki i Marvanu, ukazuje na uticaj ribnjaka kroz pogoršanje kvaliteta vode nizvodno od njega. Biotički indeks BMWP je u suprotnosti sa prethodnim indeksom kada je reč o kvalitetu vode neposredno ispod ribnjaka, i indeksi diverziteta (Simpsonov i Šenonov indeks) koji ukazuju na najveći diverzitet vrsta na prvom lokalitetu, a najmanji na drugom lokalitetu.

➤ Jedan od uticaja ribnjaka jeste i zastupljenost različitih trofičkih grupa koje su osetljive na zagađenje na istraživanim lokalitetima. Uticaj ribnjaka se ogleda u smanjenju procenta sekača na lokalitetima nizvodno od ribnjaka, a povećanje procenta sakupljača, aktivnih i pasivnih sakupljača filtratora.

7. LITERATURA

-
- Abdel-Baki, A.S., Dkhil, M.A., Al-Quraishy, S. (2011): Bioaccumulation of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2541-2547.
- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., Pörtner, H. (1998): Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B*, 120, 425-435.
- Agah, H., Leermakers, M., Elskens, M., Fatemi, S.M.R., Baeyens, W. (2009): Accumulation of trace metals in the muscles and liver tissues of five fish species from the Persian Gulf. *Environmental Monitoring and Assessment*, 157, 499- 514.
- Ahmad, S. (1995): Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29, 135–157.
- Allan, D. (1995): *Stream Ecology. Structure, function of running waters*. Chapman, Hall, London, 388 pp.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Förlin, L. (2008): Oxidative damage in rainbow trout caged in a polluted river. *Marine Environmental Research*, 66(1), 90-91.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Al-Shami, S., Rawi, C., Nor, S., Ahmad, A., Ali, A. (2010): Morphological Deformities in *Chironomus* spp. (Diptera:Chironomidae) Larvae as a Tool for Impact Assessment of Anthropogenic and Environmental Stresses on Three Rivers in the Juru River System, Penang, Malaysia. *Entomological Society of America*, 39(1), 210-222.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915–7922.
- Anderson, M. E. (1996): *Free Radicals: A Practical Approach*, eds. (Punchad, N. A., and Kelly, F. J., Oxford Press University.

-
- Armitage, P.D., Moss, D., Wright J.F., Furse, M.T. (1983): The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running water sites. *Water Research*, 17, 333–347.
- Bafana, A., Dutt, S., Kumar, A., Kumar, S., Ahuja, P.S. (2011): The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 129-138.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2005): Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B*, 142, 335-341.
- Bain, M.B., Harig, A.L., Loucks, D.P., Goforth, R. R., Mills, K.E. (2000): Aquatic ecosystem protection and restoration: advances in methods for assessment and evaluation. *Environmental Science & Policy*, 3(Supplement 1), 89-98.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C. (2005): Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 140, 175–186.
- Bartoli, M., Nizzoli, D., Longhi, D., Laini, A., Viaroli, P. (2007): Impact of a trout farm on the water quality of an Apennine creek from daily budgets of nutrients. *Chemistry and Ecology*, 23(1), 1-11.
- Bauernfeind, E., Soldan, T. (2012): *The Mayflies of Europe (Ephemeroptera)*. Ollerup, Denmark: Apollo Books.
- Bennett, C. (2007): A seven year of the life cycle of the mayfly *Ephemera danica*. *Freshwater Forum*, 27, 3–14.
- Berra, E., Forcella, M., Giacchini, R., Marziali, L., Rossaro, B., Parenti, P. (2004): Evaluation of enzyme biomarkers in freshwater invertebrates from Taro and Ticino river, Italy. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 40, 169–180.
- Bervoets, L., Blust, R., De Wit, M., Verheyen, R. (1997): Relationships between river sediments characteristics and trace metal concentrations in tubificid worms and chironomid larvae. *Environmental Pollution*, 95, 345-356.

-
- Besser, J., Brumbaugh, W., Allert, A., Poulton, B., Schmitt, C., Ingersoll, C.G. (2009): Ecological impacts of lead mining on Ozark streams: toxicity of sediment and pore water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 516-526
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Blagojević, D.P., Grubor-Lajšić, G. (2000): Multifunctionality of antioxidant system in insects, 52(4), 185-194.
- Boaventura, R., Pedro, A.M., Coimbra, J., Lencastre, E. (1997): Trout farm effluents: Characterization and impact on the receiving streams. *Environmental Pollution*, 95(3), 379-387.
- Bocchetti, R., Virno Lamberti, C., Pisanelli, B., Razzetti, E.M., Maggi, C., Catalano, B., Sesta, G., Martuccio, G., Gabellini, M., Regoli, F. (2008): Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 66, 24–26.
- Bonada, N., Prat, N., Resh, H.V., Statzner, B. (2006): Developments in aquatic insect biomonitoring: A Comparative Analysis of Recent Approaches. *Annual Review of Entomology*, 51, 495–523.
- Boulton, A.J. (2003): Parallels and contrasts in the effects of drought on stream macroinvertebrate assemblages. *Freshwater Biology*, 48, 1173–1185.
- Boyd, C.E. (2003): Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquacultur*, 226, 101–112.
- Boyero, L., Bailey, R. C. (2001): Organization of macroinvertebrate communities at a hierarchy of spatial scales in a tropical stream. *Hydrobiologia*, 464(1), 219-225.
- Božanić, M., Perić-Mataruga, V., Todorović, D., Živić, M., Stojanović, K., Radojević, A., Živić, I. (2017): Uticaj pastrmskog ribnjaka na anti- oksidativnu odbranu larvi *Ephemera danica* (Insecta: Ephemeroptera). XI Simpozijum entomologa Srbije 2017, sa međunarodnim učešćem, Goč, 17–21. Septembar, Zbornih plenarnih referata i rezimea, 87–88 pp.

-
- Božanić, M., Todorović, D., Živić, M., Perić – Mataruga, V., Marković, Z., Živić, I. (2018): Influence of a trout farm on antioxidant defense in larvae of *Ephemera danica* (Insecta: Ephemeroptera). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 419, 47.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantity of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Briand, J., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J., (2003): Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, 34, 361-377.
- Brown, B.E. (1977a): Effects of mine drainage on the River Hayle, Cornwall, factors affecting concentrations of copper, zinc and iron in water, sediments and dominant invertebrate fauna. *Hydrobiology*, 52, 221-233.
- Buchner, T., Abele-Oeschger, D., Theede, H. (1996): Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution, and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperatures. *Marine Ecology-Progress Series*, 143, 141-150.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L. (2010): Oxygentoxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15, 186-190.
- Burrige, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K. (2010): Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306, 7-23.
- Burrows, G., Whitton, B.A. (1983): Heavy metals in water, sediments and invertebrates from a metal-contaminated river free of organic pollution. *Hydrobiologia*, 106, 263-273.
- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 79- 110.

- Cain, D.J., Luoma, S.N., Carter, J.L., Fend, S.V. (1992): Aquatic insects as bioindicators of trace element contamination in cobble-bottom rivers and streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, 2141–2154.
- Cairns, Jr.J., Prat, J.R. (1993): A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: Rosenberg, D. M. & Resh, V. H. (Eds.). *Freshwater Biomonitoring, Benthic Macroinvertebrates*. Chapman, Hall, New York. 10-27 pp.
- Camargo, J. A., Gonzalo, C. (2007). Physicochemical and biological changes downstream from a trout farm outlet: comparing 1986 and 2006 sampling surveys. *Limnetica*, 26(2), 405-414.
- Camargo, J.A. (1992a): Structural and trophic alterations in macrobenthic communities downstream from a fish farm outlet. *Hydrobiologia*, 242(1), 41-49.
- Camargo, J. A., Gonzalo, C., Alonso, Á., (2011): Assessing trout farm pollution by biological metrics and indices based on aquatic macrophytes and benthic macroinvertebrates: A case study. *Ecological Indicators*, 11(3), 911-917.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A. (2005): Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58, 1255-1267.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G. (1999): Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46, 67-76.
- Cannon, H.L., Connaly, G.G., Epstein, J.B., Parker, J.G., Thorton, I., Wixson, G. (1978): Rocks: geological sources of most trace elements. in: Report to the workshop at southscas plantation Captiva Island, FL, US. *Geochemistry and the Environment*, 3, 17-31.
- Cao Y., Williams, W.P., Bark, A.W. (1996): Measuring the responses of macroinvertebrate communities to organic pollution a comparasion of multivariate approaches, biotic, diversity indices. *Hydrobiologija*, 341 (1), 1-19.
- Carter, J. L., Resh, V.H., Rosenberg, D.M., Reynoldson, T.B. (2006): Biomonitoring in North American rivers: a comparison of methods used for benthic macroinvertebrates in Canada and the United States. In: *Biological Monitoring of Rivers*, eds. G. Ziglio, G. Flaim, & M. Sillgardi, New York, USA: John Wiley & Sons Ltd. pp. 203–228.

-
- Çevik, F., Göksu, M., Derici, O., Findik O. (2009): An assessment of metal pollution in surface sediments of Seyhan dam by using enrichment factor, geoaccumulation index and statistical analyses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 152, 309-317.
- Chesters, R. (1980): Biological monitoring working party. The 1978 National Testing Exercise. Department of the Environment Water Data Unit, Technical memorandum, 19, 1-37.
- Choi, J., Roche, H., Caquet, T. (1999): Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae, a potential biomarker. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 124, 73–81.
- Clements, W., Kiffney, P. (1994): Integrated laboratory and field approach for assessing impacts of heavy metals at the Arkansas river, Colorado. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 397-404.
- Clements, W.H. (1991): Community responses of stream organisms to heavy metals: a review of descriptive and experimental approaches. 'Ecotoxicology of metals: current concepts and applications'. (Eds MC Newman, AW McIntosh) (Lewis Publishers: Chelsea), pp. 363–391.
- Cohen, T., Hee, S., Ambrose, R. (2001): Trace metals in fish and invertebrates of three California Coastal Wetlands. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 232–242.
- Corbi, J.J., Froehlich, C.G., Trivinho-Strixino, S., Dos Santos, A. (2010): Bioaccumulation of metals in aquatic insects of streams located in areas with sugar cane cultivation. *Química Nova*, 33, 644-648.
- Corbi, J.J., Trivinho-Strixino, S., Dos Santos, A. (2008): Environmental evaluation of metals in sediments and dragonflies due to sugar cane cultivation in Neotropical streams. *Water, Air, and Soil Pollution*, 195, 325–333.
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., Livingstone, D.R. (2003): Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus lacusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 289, 83– 101.
- Cummins, K. (1974): Structure and function of stream ecosystems. *BioScience*, 24(11),

631-641.

- Cummins, K. (1988): Rapid bioassessment using functional analysis of running water invertebrates. Paper presented at the Proceedings of the First National Workshop on Biological Criteria, EPA-905/9-89/003. Chicago, USA: US Environmental Protection Agency.
- Dale, V. H., Beyeler, S.C. (2001): Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecological Indicators*, 1(1), 3-10.
- De Jonge, M., Lofts, S., Bervoets, L., Blust, R. (2014): Relating metal exposure and chemical speciation to trace metal accumulation in aquatic insects under natural field conditions. *Science of the Total Environment*, 496, 11–21.
- De Leve, L. D., Kaplowitz, N. (1990): Importance and regulation of hepatic glutathione, *Seminary of Liver Disorders*, 10, 251-266.
- de Oliveira-Filho, E.C., Lopes, R.M., Paumgarten, F.J.R. (2004): Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 56, 369-374.
- De Pauw, N., Gabriels, W., Goethals, L.M.P. (2006): 'River monitoring and assessment methods based on macroinvertebrates'. (John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex)
- Despotović, S.G., Perendija, B.R., Gavrić, J.P., Borković-Mitić, S.S., Paunović, M.M., Pavlović, S.Z., Saičić, Z.S. (2012): Seasonal changes in oxidative stress biomarkers of the snail *Viviparus acerosus* from the Velika Morava River, Serbia. *Archives of Biological Science*, 64, 953-962.
- Díaz-de Alba, M., Galindo-Riaño, M.D, Casanueva-Marenco, M.J., García-Vargas, M., Kosore, C.M. (2011): Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 177–187.
- Dolédec, S., Chessel, D. (1994): Co-inertia analysis: an alternative method for studying species–environment relationships. *Freshwater Biology*, 31, 277–294.
- Doucet-Beaupré, H., Dubé, C., Breton, S., Pörtner, H.O., Blier, P.U. (2010): Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (*Bivalvia*: Unionoida). *Journal of Thermal Biology*, 35, 11-20.

- Dröge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A-H., Soto, D., Stiassny, C. A., Sullivan, C. A. (2006): Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163-182.
- Duffus, J. (2002): "Heavy metals" - a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807.
- Dukić, D. (1962): *Opšta hidrobiologija*. Naučna knjiga, Beograd.
- Dzioc, F., Henle, K., Foeckler, F., Follner, K., Scholz, M. (2006): Biological indicator systems in floodplains – a review. *International Review of Hydrobiology*, 91(4), 271-291.
- Edington, J. M., Hildrew, A. G. (1981): *A key to the caseless caddis larvae of the British Isles: with notes on their ecology*. Ambleside: Freshwater Biological Association.
- Eisler, R. (1998): *Nickel Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Biological Science Report USGS/BRD/BSR—1998-0001.
- Estevez, E., Rodríguez-Castillo, T., Álvarez-Cabria, M., Penas, F. J., González-Ferreras, A. M., Lezcano, M., Barquín, J. (2017): Analysis of structural and functional indicators for assessing the health state of mountain streams. *Ecological Indicators*, 72, 553-564.
- Eyres, J.P., Pugh-Thomas, M. (1978): Heavy metal pollution of the River Irwell (Lancashire, UK) demonstrated by analysis of substrate material and macroinvertebrate tissue. *Environmental Pollution*, 16, 129-136.
- Ezeji, T.I.N., Ezeji, A.N., Udebuani, A.C., Ezeji, E.U., Ayalogbu, E.A., Azuwike, C.O., Adjero, L.A., Ihejirika, C.E., Ujowundu, C.O., Nwaogu, L.A., Ngwogu, K.O. (2013): Environmental metals pollutants load of a densely populated and heavily industrialized commercial city of Aba, Nigeria. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 5, 1–11.

- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Salgado, M.A. (2007): Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esomriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 426-431.
- Fialkowski, W., Klonowska-Olejnika, M., Smith, B.D., Rainbow, P.S. (2003): Mayfly larvae (*Baetis rhodani* and *B. vernus*) as biomonitors of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland. *Environmental Pollution*, 121, 253–267.
- Filipović, A., Mrdaković, M., Ilijin, L., Vlahović, M., Todorović, D., Grčić, A., Perić-Mataruga, V. (2019): Effect of fluoranthene on antioxidative defense in different tissues of *Lymantria dispar* and *Euproctis chrysorrhoea* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 224, 108565.
- Flemming, C.A., Trevors, J.T. (1989): Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution*, 44, 143–158.
- Fornshell, G. (2001): Setting basin design. Western Regional Aquaculture Center, WRAC Publication 106, Seattle.
- Foy, R.H., Rosell, R. (1991): Fractionation of phosphorus and nitrogen loadings from a Northern Ireland fish farm. *Aquaculture*, 96(1), 31-42.
- Franco, R., Cidlowski, J.A. (2009): Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ*, 16, 1303-1314.
- Fridovich, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutase, *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112.
- Gabryelak, T., Piatkowska, M., Leyko, W., Pere`s, G. (1983): Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 75, 383–385.
- Gavrilović, A., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Mrkonja, A., Matić, D., Perić-Mataruga, V. (2017): Effects of benzo[a]pyrene dietary intake to antioxidative enzymes of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere*, 179, 10-19.
- Gavrilović, Lj., Dukić, D. (2002): Reke Srbije. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.

- Gavrilović, S. (1965): Određivanje režima nanosa bujičnog područja i izrada karte erozije, Beograd.
- Girgin, S., Kazancı, N., Dügel, M. (2010): Relationship between aquatic insects and heavy metals in an urbanstream using multivariate techniques. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7, 653-664.
- Gleick, P.H. (1996): Water resources. In *Encyclopedia of Climate and Weather*, ed. by S. H. Schneider, Oxford University Press, New York, vol. 2, pp.817-823.
- Glöer, P., Meier-Brook, C. (1998): Süßwassermollusken: ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. Hamburg, Germany: Deutscher Jugendbuch für Naturbeobachtung.
- Goodyear, K.L., McNeill, S. (1999): Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review. *The Science of the Total Environment*, 229, 1-19.
- Govil, P., Sorlie, J., Murthy, N., Sujatha, D., Reddy, G. (2008): Soil contamination of heavy metals in the Katedan industrial development area, Hyderabad, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 140, 313-323.
- Gremyatchikh, V., Tomilina, I.I., Grebenyuk, L.P. (2009): The effect of mercury chloride on morphofunctional parameters in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) larvae. *Inland Water Biology*, 1, 89–95.
- Griffith, O.W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2 vinyl pyridine. *Analytical Biochemistry*, 106, 207–212.
- Griffith, O.W. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), 922-935.
- Guilpart, A., Roussel, J.-M., Aubin, J., Caquet, T., Marle, M., Le Bris, H. (2012): The use of benthic invertebrate community and water quality analyses to assess ecological consequences of fish farm effluents in rivers. *Ecological Indicators*, 23, 356-365.
- Gundacker, C. (2000): Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. *Environmental Pollution*, 110, 61-71.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (1999a): Antioxidant defence enzymes: the glutathione peroxidase family. *Free Radical Biology Medicine* third ed. Oxford University

- Press Inc., New York, USA. pp 140–146, 170-172.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989): Free radicals, ageing and disease. *Free Radicals in Biology and Medicine*, second ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999b): *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Hamidian, A.H., Zareh, M., Poorbagher, H., Vaziri, L., Ashrafi, S. (2016): Heavy metal bioaccumulation in sediment, common reed, algae, and blood worm from the Shoor river, Iran. *Toxicology and Industrial Health*, 32, 398–409.
- Hare, L., Tessie, A., Campbell, P.G.C. (1991): Trace element distribution in aquatic insects: variations among genera, elements, and lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48, 1481–1491.
- Harrahy, E.A., Clements, W.H. (1997): Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Dipter: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 317–327.
- Hatami, R., Mahboobi Soofiani, N., Ebrahimi, E., Hemami, M. (2011): Evaluating the aquaculture effluent impact on macroinvertebrate community and water quality using BMWP index. *Journal of Environmental Studies*, 37(59), 13.
- Hauer, F.R., Stanford, J.A., Giersch, J.J., Lowe, W.H. (2000): Distribution and abundance patterns of microinvertebrates in a mountain stream: An analysis along multiple environmental gradients. *Verhandlungen der Internationalen für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 27, 1485-1488.
- Hawkes, H.A. (1979): Invertebrates as indicators of river water quality. In: *Biological Indicators of Water Quality*. eds. A. James & L. Evison, Chichester, England: John Wiley & Sons. Chapter 2, pp. 1-45.

-
- Hellawell, J.M. (2012): Biological indicators of freshwater pollution and environmental management: Springer Science & Business Media.
- Hellawell, J.M. (1986): Biological indicators of fresh-water pollution and environmental management. London: Elsevier Appl. Sci. Publ.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P., Batley, G.E. (2014): The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. Integrated environmental assessment and management, 10(3), 327-341.
- <http://www.sepa.gov.rs>
- Hughes, B.D. (1978): The influence of factors other than pollution on the value of Shannon's diversity index for benthic macro-invertebrates in streams. Water Research, 12(5), 359- 364.
- Hyne, R.V., Maher, W.A. (2003): Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54, 366–374.
- Hynes, H.B.N. (1979): The ecology of running waters. Toronto, Canada: University of Toronto Press.
- Illies, J. (1952): Die Mölle. Faunistisch-ökologische Untersuchungen an einem Forellenbach im Lipper Bergland. Archiv für Hydrobiologie, 46, 424-612.
- Iversen, T.M. (1995): Fish farming in Denmark: Environmental impact of regulative legislation. Water Science and Technology, 31, 73-84.
- Izquierdo, C., Usero, J., Gracia, I. (1997): Speciation of heavy metals from salt marshes on the nsouthern Atlantic coast of Spain. Marine Pollution Bulletin, 34(2), 123–8.
- Jacob, U. (2003): Baetis Leach 1815, sensu stricto oder sensu lato. Ein Beitrag zum Gattungskonzept auf der Grundlage von Artengruppen mit Bestimmungsschlüsseln. Lauterbornia, 47, 59-129.
- Jop, K.M. (1991): Concentration of metals in various larval stages of four Ephemeroptera species. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 46, 901-905.
- Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood, C. (2002): Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. Journal of Experimental Biology, 205, 279-290.

-
- Kendra, W. (1991): Quality of salmonid hatchery effluents during a summer low-flow season. *Transactions of the American Fisheries Society*, 120(1), 43-51.
- Kerans, B., Karr, J. R. (1994): A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecological Applications*, 4(4), 768-785.
- Knoben, R.A.E., Roos, C., Van Oirschot, M.C.M. (1995): *Biological Assessment Methods for Watercourses*. UN/ECE Task Force on Monitoring & Assessment, Volume 3. Working programme 1994/1995. Lelystad, Netherlands: October 1995.
- Kolkwitz, R., Marsson, M. (1909): Ökologie der tierischen Saprobien: Beiträge zur Lehre von der biologischen Gewässerbeurteilung. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 2(1-2), 126-152.
- Kotaś, J., Stasicka, Z. (2000): Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, 107, 263-283.
- Kovačević-Majkić, J. (2009): *Hidrogeografska studija reke Skrapež*. Beograd: Geografski institut „Jovan Cvijić” SANU.
- Kronvang, B., Ertebjerg, G., Grant, R., Kristensen, P., Hovmand, M., Kirkegaard, J. (1993): Nationwide monitoring of nutrients and their ecological effects: state of the Danish aquatic environment. *Ambio*, 22, 176-187.
- Krpo-Ćetković J., Stamenković, S., Plećaš, M., Ćetković, A., Bila-Dubaić, J., Subotić, S. (2014): *Ekologija životinja – praktikum*. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet, Beograd, Srbija.
- Kruidenier, L., Verspaget, H.W. (2002): Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 1997-2015.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. (2011): Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 193-201.
- Lamouroux, N., Dolédec, S., Gayraud, S. (2004): Biological traits of stream macroinvertebrate communities: Effects of macrohabitat, reach, and basin filters. *Journal of the North American Benthological Society*, 23(3), 449-466.
- Landa, V. (1968): Developmental cycles of central European Ephemeroptera and their

- interrelations. *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 65, 276-284.
- Lechthaler, W., Car, M. (2005): Simuliidae: Key to Larvae and Pupae from Central and Western Europe (Version CD-Rom-Edition). Vienna: Eutaxa-Technisches Büro für Biologie.
- Lemaire, P., Livingstone D.R. (1993): Pro-oxidant/antioxidant processes and organic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology*, 1, 1119–1147.
- Leonard, E.M., Wood, C.M. (2013): Acute toxicity, critical body residues, Michaelis–Menten analysis of bioaccumulation, and ionoregulatory disturbance in response to waterborne nickel in four invertebrates: *Chironomus riparius*, *Lymnaea stagnalis*, *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 158, 10-21.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J. (2003b): Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol*, 42, 85-89.
- Liao, P.B. (1970): Pollution potential of salmonid fish hatcheries. *Water sewage works*, 117: 291-297.
- Livingstone, D.R. (2001): Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 656-666.
- Livingstone, D.R. (2003): Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Veterinaire*, 154, 427-430.
- Livingstone, D.R., Martinez, P.G., Winston, G.W. (1989): Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 15, 213-236.
- Loch, D. D., West, J. L., Perlmutter, D. G. (1996): The effect of trout farm effluent on the taxa richness of benthic macroinvertebrates. *Aquaculture*, 147(1–2), 37- 55.
- Loska, K., Cebula, J., Pelczar, J., Wiechula, D., Kwapulinski, J. (1997): Use of enrichment, and contamination factors together with geoaccumulation indexes to

- evaluate the content of Cd, Cu, and Ni in the Rybnik water reservoir in Poland. *Water, Air and Soil Pollution*, 93, 347–365.
- Luoma, S. (1983): Bioavailability of trace metals to aquatic organisms-a review. *Science of the Total Environment*, 28, 1-22.
- Lushchak, V.I. (2011): Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30.
- MacDonald, D.D., Ingersoll, C. G., Berger, T. A. (2000): Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 20–31.
- Mackay, D., Fraser, A. (2000): Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110 (3), 375-391.
- Mahmoud, N., Dellali, M., El Bour, M., Aissa, P., Mahmoudi, E., (2010): The use of *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardiidae) in the biomonitoring of Bizerta lagoon: A multimarkers approach. *Ecological Indicators*, 10, 696-702.
- Malik, N., Biswas, A.K, Qureshi, T.A, Borana, K., Virha, R. (2010): Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160, 267–276
- Markert, B. (1994): Biomonitoring – Quo vadis. *UWSF-Z. Umweltchem. Okotox*, 6, 145-149.
- Marković Z., Poleksić. V. (2011): Ribarstvo u Srbiji (Fishery in Serbia). Prof. dr Zoran Marković, Beograd, 1-289.
- Marković, Z. (1995): Reka Đetinja, makrozoobentos u oceni kvaliteta vode. Užice, Srbija: Ministarstvo za zaštitu životne sredine Republike Srbije i Naučno- istraživački centar Užice.
- Marković, Z., Miljanović, B., Mitrović-Tutundžić, V. (1999): Makrozoobentos kao pokazatelj kvaliteta vode reke Kolubare. *Godišnjak Jugoslovenskog društva za zaštitu voda*, 261-266.
- Marković, Z., Mitrović-Tutundžić, V., Miljanović, B. (1997): Effect of pollution on the macrozoobenthos diversity and structure in the river Obnica (Serbia, Yugoslavia). *Ekologija*, 32(2), 37-46.

- Marković, Z., Poleksić V., Živić I., Stanković, M., Ćuk, D., Spasić, M., Dulić Z., Rašković, B, Ćirić, M., Bošković, D., Vukojević, D. (2009): Stanje ribarstva u Srbiji. Conference proceedings VII International conference "Water & Fish", Faculty of Agriculture, University of Belgrade – Serbia. May, 27-29. 2009, Belgrade, Serbia, 30-39 pp.
- Mates, J. M. (2000): Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1), 83-104.
- Matić, D. (2013): Potencijalna uloga gubara (*Lymantria dispar*, L.) kao bioindikatora zagađenosti životne sredine: uticaj hroničnog izlaganja kadmijumu na razviće, aktivnosti digestivnih enzima srednjeg creva, mehanizme detoksifikacije i stepen oštećenja DNK. Doktorska disertacija. Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu.
- Matović, V., Plamenac-Bulat, Z., Đukić, D. (2004): Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitni sistem. *Jugoslovenska Medicinska Biohemija*, 23, 117-126.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1988): Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5-6), 363-369.
- Miller, P., Lanno, R., McMaster, M., Dixon, D. (1993): Relative contributions of dietary and waterborne copper to tissue copper burdens and waterborne copper tolerance in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 50, 1683- 1689.
- Mirčić, D. (2013): Uticaj kadmijuma na sistem antioksidativne zaštite i varijabilnost komponenti adaptivne vrednosti gubara *Lymantria dispar* L. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Mirčić, D., Stojanović, K., Živić, I., Todorović, D., Stojanović D., Dolićanin. Z., Perić-Mataruga, V. (2016): The troutfarm effect on *Dinocras megacephala* (Plecoptera: Perlidae) larvae: antioxidative defense. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1775-1782.
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972): The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170-3175.

- Moog, O. (2002): Fauna Aquatica Austriaca. 2nd edition. Wassewirtschaftskataster, Bundesministerium für Land-und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft. Wien, Austria: Austrian Federal Ministry of Agriculture Forestry Environment & Water Management, Wassewirtschaftskataster Vienna.
- Morales, M., Martínez-Paz, P., Martín, R., Planelló, R., Urien, J., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G. (2014): Transcriptional changes induced by in vivo exposure to pentachlorophenol (PCP) in *Chironomus riparius* (Diptera) aquatic larvae. *Aquatic Toxicology*, 157, 1-9.
- Morillo, J., Usero, J., Gracia, I. (2002): Partitioning of metals in sediments from the Odiel river (Spain). *Environment International*, 28, 263–71.
- Muysen, B.T.A., Brix, K.V., DeForest, D.K., Janssen, C.R. (2004): Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 12, 113–131.
- Nagajyoti, P., Lee, K., Sreekanth, T. (2010): Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 199-216.
- Namin, J.I., Sharifinia, M., Makrani, A.B. (2013): Assessment of fish farm effluents on macroinvertebrates based on biological indices in Tajan River (north Iran). *Canadian Journal of Earth Sciences*, 11, 29–39.
- Niemi, G.J., McDonald, M.E. (2004): Application of ecological indicators. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 89-111.
- Nilsson, A.N. (1996): Aquatic insects of North Europe: a taxonomic handbook. Volume 1: Ephemeroptera, Plecoptera, Heteroptera, Neuroptera, Megaloptera, Coleoptera, Trichoptera, Lepidoptera. Denmark: Apollo Books.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A. G. (2001): Antioxidant enzymes in brackish water oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Science of the Total Environment*, 281, 237-246.
- Norris, R.H., Georges, A. (1993): Analysis, interpretation of benthic macroinvertebrate surveys, In: Rosenberg, D. M. & Resh, V. H. (Eds.). *Freshwater biomonitoring, benthic macroinvertebrates*. Chapman & Hall, London. 234-286 pp.
- Norris, R.H., Norris, K.R. (1995): The need for Biological assessment of water quality:

- Australian perspective. *Australian Journal of Ecology*, 20, 1-6.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R. (2005): Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution*, 138, 178-190.
- Nummelin, M., Lodenius, M., Tulisalo, E., Hirvonen, H., Alanko, T. (2007): Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 145, 339–347.
- Paisley, M.F., Trigg D.J., Walley. W.J. (2014): Revision of the biological monitoring working party (BMWP) score system: derivation of present-only and abundance-related scores from field data. *River Research and Applications*, 30, 887–904.
- Pander, J., Geist, J. (2013): Ecological indicators for stream restoration success. *Ecological Indicators*, 30, 106-118.
- Pantle, E., Buck, H. (1955): Die biologische Überwachung der Gewässer und die Darstellung der Ergebnisse, *Gas-und Wasserfach*, 96, 604.
- Paunović, M. (2007): Struktura zajednica makroinvertebrata kao indikator tipova tekućih voda Srbije. Doktorska disertacija. Beograd, Srbija: Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Paunovic, M., Jakovcev-Todorovic, D., Simic, V., Stojanovic, B., Cacic, P. (2007): Macroinvertebrates along the Serbian section of the Danube River (stream km 1429–925). *Biologia*, 62(2), 214-221.
- Peakall, D.W. (1994): Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1, 55-60.
- Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Todorović, D., Prokić, M., Matić, D., Vlahović, M. (2019): Parameters of oxidative stress, cholinesterase activity, Cd bioaccumulation in the brain and midgut of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) caterpillars from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere*, 218, 416-424.
- Petrović, A., Milošević, D., Paunović, M., Simić, S., Đorđević, N., Stojković, M., Simić, V. (2015): New data on the distribution and ecology of the mayfly larvae (Insecta: Ephemeroptera) of Serbia (central part of the Balkan Peninsula). *Turkish Journal of*

- Zoology, 39, 195-209.
- Pillot, H. (1984a): De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). 1A: Inleiding, Tanypodinae & Chironomini. Leiden, Nederland: St. EIS Nederland.
- Pillot, H. (1984b): De larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). 1B: Orthoclaadiinae sensu lato (Vol. 1). Leiden, Nederland: St. EIS Nederland.
- Pillot, H. (2009): Chironomidae larvae. Biology and Ecology of the Chironomini. Zeist, Netherlands: KNNV Publishing.
- Poulton, B.C., Beitinger, T.L., Stewart, K.W. (1989): The Effect of Hexavalent Chromium on the Critical Thermal Maximum and Body Burden of Clopper Clio (Plecoptera: Perlodidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 18, 594-600.
- Pourang, N. (1996): Heavy metal concentrations in surficial sediments and benthic macroinvertebrates from Anzali wetland, Iran. Hydrobiologia, 331, 53-61.
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Camean, A.M. (2009): Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. Toxicology In Vitro, 23, 1445-1449.
- Pulatsu, S., Rad, F., Köksal, G., Aydın, F., Benli, A. K., Topçu, A. (2004): The mimpact of rainbow trout farm effluents on water quality of Karasu stream, Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 4(1), 9-15.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1991): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Archives of Biochemistry and Biophysics, 288(2), 481-487.
- Radojević, A., Mirčić, D., Živić, M., Perić-Mataruga, V., Božanić, M., Stojanović, K., Lukičić, J., Živić, I. (2019): Influence of trout farm effluents on selected oxidative stress biomarkers in larvae of *Ecdyonurus venosus* (Ephemeroptera, Heptageniidae). Archives of Biological Sciences, 71(2), 225-233.
- Radojević, A., Mirčić, D., Živić, M., Perić-Mataruga, V., Todorović, D., Božanić, M., Živić, I. (2017): Antioksidativni status larvi *Ecdyonurus venosus* (Ephemeroptera: Heptagenidae): Uticaj pastrmskih ribn- jaka. XI Simpozijum entomologa Srbije 2017, sa međunarodnim učešćem, Goč, 17-21 Septembar, Zbornih plenarnih referata i rezimea, pp. 88-89 pp.

-
- Rainbow, P.S., Wang, W.X. (2001): Comparative assimilation of Cr, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. Marine Ecology Progress Series, 218, 239–248.
- Rainbow, P.S. (2002): Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environmental Pollution, 120, 497–507.
- Rauch, J., Graedel, T. (2007): Earth's anthropiogeochemical copper cycle. Global Biogeochemistry Cy, 21.
- Rauch, J., Pacyna, J. (2009): Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles. Global Biogeochemistry Cy, 23.
- Regoli, F., Principato, G. (1995): Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquatic Toxicology, 31, 143-164.
- Regoli, F., Hummel, H., Amirad-Triquet, C., Larroux, C., Sukhotin, A. (1998): Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 35, 594- 601.
- Reid, D.J., MacFarlane, G.R. (2003): Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. Environmental Pollution, 126, 147-155.
- Resh, V. H., Jackson, J. K. (1993): Rapid assessment approaches to biomonitoring using benthic macroinvertebrates. 159-194 pp. In: Rosenberg, D. M. & V. H. Resh (Eds.). Freshwater Biomonitoring, Benthic Macroinvertebrates. Chapman, Hall, V.H. New York.
- Resh, V.H., Cardé, R. T. Amsterdam, Netherlands: Academic Press. pp. 373-380.
- Rozkošný, R. (1980): Key for determination of larvae of water insects. Praha: Československa Akademie Ved.
- Santos, A., Oliveira, L.C., Botero, W.G., Mendonça, A.G.R., Dos Santos, F.A., Rocha, J.C., Ribeiro, M.L., Oliveira, A.S. (2009): Distribuição e biodisponibilidade de crômio em solos contaminados por resíduos de couro. Quim Nova, 7, 1693-1697.

- Schlechtriem, C. (2015): Pesticide contamination in farmed fish- exposure pathways, bioaccumulation and consumer risk. Conference proceedings 7th International conference “Water & Fish”, Faculty of Agriculture, University of Belgrade – Serbia. June, 10 – 12. 2015, Belgrade, Serbia, 101-102 pp.
- Schueler, T. (2000): Cars are leading source of metal loads in California. Ellicott City: The Practice of Watershed Protection.
- Selong, J.H., Helfrich, L.A. (1998): Impacts of trout culture effluent on water quality and biotic communities in Virginia headwater streams. *The Progressive Fish-Culturist*, 60(4), 247-262.
- Shahbaz, M., Hashmi, M.Z., Malik, R.N., Yasmin, A. (2013): Relationship between heavy metals concentrations in egret species, their environment and food chain differences from two Headworks of Pakistan. *Chemosphere*, 93, 274-282.
- Shannon, C. E., Weaver, W. (1949): The mathematical theory of communication. Urbana & Chicago, USA: University of Illinois Press.
- Sharma, S. K. (2014): Heavy Metals in Water: Presence, Removal and Safety. Royal Society of Chemistry.
- Shulkin, V.M., Presleyb, B.J., Kavunc, V.I. (2003): Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environment International*, 29, 493 – 502.
- Sies, H., Cadenas, E., Symons, M. C. R., Scott, G. (1985): Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.
- Silva, C, Mattioli, M., Fabbri, E., Yáñez, E., Delvalls, T. A., Martín-Díaz, M. L. (2012): Benthic community structure and biomarker responses of the clam *Scrobicularia plana* in a shallow tidal creek affected by fish farm effluents (Rio San Pedro, SW Spain). *Environment International*, 47, 86–98.
- Simić, S., Simić, V. (2009): Ekologija kopnenih voda (Hidrobiologija I). Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Simpson, E. (1949): Measurement of Diversity. *Nature*, 163, 688.
- Službeni glasnik RS (50/2012): Uredba o graničnim vrednostima zagađivača u

- površinskim i podzemnim vodama i sedimentima i rokovima za njihovo postizanje. Službeni glasnik RS (74/2011). Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda.
- Snodgrass, J., Casey, R., Joseph, D., Simon, J. (2008): Microcosm investigationsof storm water pond sediment toxicity to embryonic and larval amphibians: variation in sensitivity among species. *Environmental Pollution*, 154, 291-297.
- Soldán, T., Landa, V. (1999): A key to the Central European species of the genus *Rhithrogena* (Ephemeroptera: Heptageniidae). *Klapalekiana*, 35, 25-37.
- Stadtman, E.R., Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E. (1991): Implication of metal-catalyzed oxidation of enzymes in aging, protein turnover, and oxygen toxicity. *The Korean Journal of Biochemistry*, 23, 49-54.
- Štajn, A.Š., Žikić, R.V., Saičić, Z.S. (2007): Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-449.
- Stanković, M. (2013): Uticaj smeša koncentrata sa različitim učešćem proteina i masti na prirast i konverziju hrane u ishrani mlađi šarana (*Cyprinus carpio*, L., 1758). Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu.
- Stanković, S. (1924): Studije na izvorskim i potočnim planarijama Balkanskog poluostrva. Knjiga CXIII, Glas SKA, Beograd.
- Stanković, S. (1928): O jednoj novoj larvi i nimfi torentikolnih trihoptera, *Thremma* sp. Glasnik skopskog naučnog društva, Knjiga IV, Odeljenje prirodnih nauka, sveska 1, 121-128.
- Stojanović, K. Z. (2017): Uticaj pastrmskih ribnjaka na zajednice makrozoobentosa tekućica sa posebnim osvrtom na larve roda *Baetis* (Ephemeroptera, Insecta). Doktorska disertacija Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Stojanović, K., Živić, M., Marković, Z., Đorđević, J., Jovanović, J., Živić, I. (2019): How changes in water quality under the influence of land-based trout farms shape chemism of the recipient streams – case study from Serbia. *Aquaculture International*.

-
- Stolyar, O. B., Lushchak, V.I. (2012): Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. INTECH Open Access Publisher.
- Suthar, S., Arvind, K., Chabukdhara, M., Gupta, S. (2009): Assessment of metals in water and sediments of Hindon River, India: impact of industrial and urban discharges. *Journal of Hazardous Materials*, 178, 1088-1095.
- Svensson, B. (1977): Life cycle, energy fluctuations and sexual differentiation in *Ephemera danica* (Ephemeroptera), a stream-living mayfly. Copenhagen: Oikos.
- Tamura, M., Oschino, N., Chance, B. (1982): Some characteristics of hydrogen and alkyl-hydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *The Journal of Biochemistry*, 92: 1019-1031.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S., Olivier, J.M. (1997): ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, 7, 75–83.
- Todorović, D., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Filipović, A., Grčić, A., Perić-Mataruga, V. (2019): Long-term exposure of cockroach *Blattella germanica* (Insecta: Blattellidae) nymphs to magnetic fields of different characteristics: effects on antioxidant biomarkers and nymphal gut mass. *International Journal of Radiation Biology*, 95(8), 1185-1193.
- Todorović, D., Perić-Mataruga, V., Mirčić, D., Ristić-Djurović, J., Prolić, Z., Petković, B., Savić, T. (2015): Estimation of changes in fitness components and antioxidant defense of *Drosophila subobscura* (Insecta, Diptera) after exposure to 2.4 T strong static magnetic field. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5305-5314.
- Tolkamp, H.H. (1984): Biological Assessment of water quality in running water using macroinvertebrates: a case study for Limburg, The Netherlands. *Water Science & Technology*, 17, 867-878.
- Tolkamp, H.H. (1985): Using several indices for biological assessment of water quality in running water, 22, 2281-2286.
- U.S EPA Method 200.3. 1996. Sample Preparation Procedure for Spectrochemical Determination of Total Recoverable Elements in Biological Tissues.

-
- U.S. EPA. Method 200.7. 1994. Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, Revision 4.4. U.S. Environmental Protection Agency.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006): Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 37-56.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.
- Vannote, R. L., Minshall, W. G., Cummins, K. W., Sedell, J. R., Cushing, C. E. (1980): The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 130-137.
- Velebit B., Jovanović J., Babić J., Milijašević M., Vesković-Moračanin S., Borović B., Spirić, A. (2009): Stanje ekosistema za uzgoj pastrmke sa aspekta mikrobiološkog rizika. Conference proceedings VII International conference "Water & Fish", Faculty of Agriculture, University of Belgrade – Serbia. May, 27-29. 2009, Belgrade, Serbia, 81-85 pp.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M. (1990): Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C*, 97, 37- 42.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. (2007): The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(3), 281-300.

- Vicente-Martorell, J.J., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., Granado-Castro, M.D. (2009): Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2), 823-836.
- Vlahović, M., Ilijin, L., Mrdaković, M., Todorović, D., Matic, D., Lazarević, J., Perić-Mataruga, V. (2016): Glutathione S-transferase in the midgut tissue of gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars exposed to dietary cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44, 13-17.
- Vranković, J. (2016): Age-related changes in antioxidant and glutathione S-transferase enzyme activities in the Asian clam. *Biochemistry (Moscow)*, 81,339-49.
- Vranković, J., Slavić, M. (2015): Biomarker responses in *Corbicula fluminea* to the presence of dioxin-like polychlorinated biphenyls and seasonal changes. *Ecological Indicators*, 48, 99–106.
- Vranković, J. (2015): Environmental impact on the antioxidant responses in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Veneroidea: Corbiculidae) from the Danube River. *Italian Journal of Zoology*, 82, 378-86.
- Vranković, J., Labus-Blagojević, S., Csanyi, B., Makovinska, J., Cvetković, O., Gačić, Z., Blagojević, D., Paunović, M., (2012): Antioxidant enzymes and GST activity in natural populations of *Holandriana holandrii* from the Bosna River. *Turkish Journal of Biology*, 36, 477-485.
- Vranković, J., Živić, M., Radojević, A., Perić-Mataruga, V., Todorović, D., Marković, Z., Živić, I. (2018): Evaluation of oxidative stress biomarkers in the freshwater gammarid *Gammarus dulensis* exposed to trout farm outputs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 84-95.
- Wang, W.X. (2002): Interactions of trace metals and different marine food chains. *Marine Ecology Progress Series*, 243, 295–309.
- Waringer, J., Graf, W. (1997): Atlas der österreichischen Köcherfliegenlarven: unter Einschluss der angrenzenden Gebiete. Wien: Facultas Universitätsverlag.
- Washington, H.G. (1984): Diversity, biotic, similarity indices: A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*, 18 (6), 653-694.

- Watras, C.J., MacFarlane, J., Morel, F.M.M. (1985): Nickel Accumulation by *Scenedesmus* and *Daphnia*: Food-Chain Transport and Geochemical Implications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 724-730.
- Weston, D.P., Phillips, M.J., Kelly, L.A. (1996): Environmental impacts of salmonid culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, (29), 919-967
- WFD (2000). The EU Water Framework Directive – integrated river basin management for Europe: Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, 23 October 2000. http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html
- WHO International Programme on chemical safety - IPCS (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Winkelmann, C., Koop, J.H.E. (2007): The management of metabolic energy storage during the life cycle of mayflies: a comparative field investigation of the collector-gatherer *Ephemera danica* and the scraper *Rhithrogena semicolorata*. *Journal of Comparative Physiology B*, 177, 119–128.
- Woynarovich, A., Hoitsy, G., Moth-Poulsen, T. (2011): Small-scale rainbow trout farming: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Wu, S., Zhou, S., Li, X. (2011): Determining the anthropogenic contribution of heavy metal accumulations around a typical industrial town: Xushe, China. *Journal of Geochemical Exploration*, 110, 92-97.
- Zelinka, M., Marvan, P. (1961): Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie*, 57(3), 389-407.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 337-349.
- Živić, I. (2005): Faunistička i ekološka studija makrozoobentosa tekućica sliva Južne Morave sa posebnim osvrtom na taksonomiju larvi Trichoptera (Insecta). Doktorska disertacija. Beograd: Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu.

- Živić, I., Marković, Z., Brajković, M. (2002): Dynamics and distribution of macrozoobenthos in the Toplica river, a tributary of the Kolubara. *Archives of Biological Science*, 54(1-2), 19-27.
- Živić, I., Marković, Z., Živić, M. (2009a): Influence of a trout farm on macrozoobenthos communities of the Trešnjica River, Serbia. *Archives of Biological Science*, 61 (3), 483-502.
- Živić, I., Marković, Z., Živić, M. (2009b): Influence of a trout farm on macrozoobenthos communities of the Trešnjica River, Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 61(3), 483-492.
- Živić, I., Marković, Z., Filipović – Rojka, Z., Živić, M. (2009): Influence of a trout farm on water quality and macrozoobenthos communities of the receiving stream (Trešnjica River, Serbia). *International Review of Hydrobiology*, 94,673–687.
- Zoumis, T., Schmidt, A., Grigorova, L., Calmano, W. (2001): Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *Science of The Total Environment*, 266, 195–202.
- Zwick, P. (2004): Key to the West Palaearctic genera of stoneflies (Plecoptera) in the larval stage. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 34(4), 315-348.

9. Prilog

Tabela 1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež

	Taksoni	Taksonomska pripadnost	SK1	SK2	SK3	SK4
1.	Platyhelminthes <i>Dugesia lugubris</i> (Schmidt, 1861)	Turbellaria - Dugesiidae	+	+	+	+
2.	Mollusca <i>Planorbarius</i> sp.	Gastropoda - Planorbiidae			+	
3.	<i>Radix peregra</i> (Müller, 1774)	Gastropoda - Lymnaeidae	+	+	+	+
4.	<i>Myxas glutinosa</i> (Müller, 1774)	Gastropoda - Lymnaeidae				+
5.	<i>Valvata cristata</i> (Müller, 1774)	Gastropoda - Valvatidae		+		+
6.	<i>Pisidium</i> sp.	Bivalvia - Sphaeridae		+	+	+
7.	Annelida Oligochaeta	Oligochaeta	+	+	+	+
8.	Crustacea <i>Gammarus balcanicus</i> Schaferna, 1922	Amphipoda - Gammaridae	+	+		+
9.	<i>Gammarus fossarum</i> (Koch, 1836)	Amphipoda - Gammaridae		+	+	+
10.	<i>Gammarus</i> sp.	Amphipoda - Gammaridae	+		+	+
11.	Insecta - Odonata <i>Cordulegaster annulatus</i> (Latreille, 1804)	Odonata – Cordulegasteridae			+	+
12.	Insecta - Ephemeroptera <i>Baetis alpinus</i> (Pictet, 1843)	Ephemeroptera - Baetidae	+			+
13.	<i>Baetis rhodani</i> (Pictet, 1843)	Ephemeroptera - Baetidae		+	+	
14.	<i>Baetis</i> sp.	Ephemeroptera - Baetidae		+		
15.	<i>Ecdyonurus venosus</i> (Fabricius, 1775)	Ephemeroptera- Heptageniidae	+	+	+	+
16.	<i>Ecdyonurus</i> sp.	Ephemeroptera- Heptageniidae	+	+	+	+
17.	<i>Epeorus assimilis</i> Eaton, 1885	Ephemeroptera- Heptageniidae	+	+	+	+
18.	<i>Epeorus</i> sp.	Ephemeroptera- Heptageniidae	+			
19.	<i>Rhitrogena semicolorata</i> gr.	Ephemeroptera- Heptageniidae		+	+	
20.	<i>Rhitrogena germanica</i> (Eaton, 1885)	Ephemeroptera- Heptageniidae			+	
21.	<i>Rhitrogena</i> sp.	Ephemeroptera- Heptageniidae	+	+		+
22.	Fam. Heptageniidae	Ephemeroptera- Heptageniidae			+	+

Nastavak Tabele 1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež

	Taksoni	Taksonomska pripadnost	SK1	SK2	SK3	SK4
	Insecta - Ephemeroptera					
23.	<i>Ephemera danica</i> Müller, 1764	Ephemeroptera - Ephemeridae	+	+	+	+
24.	<i>Ephemerella ignita</i> (Poda, 1761)	Ephemeroptera - Ephemerellidae			+	+
25.	<i>Ephemerella mucronata</i> (Bengtsson, 1909)	Ephemeroptera - Ephemerellidae	+	+		+
26.	<i>Ephemerella</i> sp.	Ephemeroptera - Ephemerellidae		+		
27.	Fam. Ephemerellidae	Ephemeroptera - Ephemerellidae		+		
28.	<i>Paraleptophlebia</i> sp.	Ephemeroptera - Leptophlebiidae		+		+
29.	Fam. Leptophlebiidae	Ephemeroptera - Leptophlebiidae				+
	Insecta - Plecoptera					
30.	<i>Perla marginata</i> (Panzer, 1799)	Plecoptera - Perlidae		+		
31.	<i>Capnia</i> sp.	Plecoptera - Capnidae		+	+	
	Insecta - Coleoptera					
32.	<i>Elmis maugetii</i> Latreille, 1802	Coleoptera - Elmidae	+	+	+	+
33.	<i>Elmis</i> sp.	Coleoptera - Elmidae	+	+	+	
34.	<i>Esolus parallelepipedus</i> (Muller, 1806)	Coleoptera - Elmidae	+	+	+	+
35.	<i>Limnius volckmari</i> (Panzer, 1793)	Coleoptera - Elmidae	+	+	+	+
36.	<i>Limnius</i> sp.	Coleoptera - Elmidae	+	+	+	+
37.	<i>Oulimnius</i> sp.	Coleoptera - Elmidae			+	+
38.	<i>Ochthebius</i> sp.	Coleoptera - Hydraenidae			+	
39.	<i>Hydraena</i> sp.	Coleoptera - Hydraenidae				+
40.	<i>Pomatinus substriatus</i> (Muller, 1806)	Coleoptera - Dryopidae				+
41.	Fam. Hydrophilidae	Coleoptera - Hydrophilidae	+			+
	Insecta - Megaloptera					
42.	<i>Sialis fuliginosa</i> (Pictet, 1836)	Megaloptera - Sialidae	+			
	Insecta - Diptera					
43.	<i>Atherix ibis</i> (Fabricius, 1798)	Diptera - Athericidae	+	+	+	+
44.	<i>Atherix</i> sp.	Diptera - Athericidae	+		+	+
45.	<i>Bezzia</i> sp.	Diptera - Ceratopogonidae	+		+	+
46.	<i>Blepharicera fasciata</i> (Westwood, 1842)	Diptera - Blepharicaeridae				+
47.	<i>Dicranota bimaculata</i> (Schummel, 1829)	Diptera - Tipuloidea - Pediciidae		+		+

Nastavak Tabele 1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež

	Taksoni	Taksonomska pripadnost	SK1	SK2	SK3	SK4
	Insecta - Diptera					
48.	<i>Dicranota</i> sp.	Diptera - Tipuloidea - Pediciidae		+	+	
49.	<i>Hemerodromia</i> sp.	Diptera - Empididae	+		+	+
50.	<i>Hexatoma bicolor</i> (Meigen, 1818)	Diptera - Tipuloidea - Limoniidae	+	+	+	+
51.	<i>Hexatoma</i> sp.	Diptera - Tipuloidea - Limoniidae	+	+		+
52.	<i>Limnophila</i> sp.	Diptera - Limoniidae		+		
53.	<i>Odontomyia</i> sp.	Diptera - Stratiomyidae		+		
54.	<i>Psychoda</i> sp.	Diptera - Psychodidae			+	
55.	<i>Tabanus</i> sp.	Diptera - Tabanidae	+	+	+	+
56.	<i>Tipula</i> sp.	Diptera - Tipulidae			+	+
57.	<i>Simulium (Simulium) ornatum</i> gr.	Diptera - Simuliidae	+	+	+	+
58.	<i>Simulium</i> sp.	Diptera - Simuliidae	+	+	+	+
59.	<i>Chironomus</i> sp.	Diptera – Chironomidae - Chironominae	+	+	+	+
60.	Podfam. Chironominae	Diptera - Chironomidae		+	+	+
61.	Fam. Chironomidae	Diptera – Chironomidae	+	+	+	+
62.	<i>Tanytus</i> sp.	Diptera – Chironomidae - Tanypodinae	+		+	+
63.	<i>Ablabesmya</i> sp.	Diptera – Chironomidae - Tanypodinae	+	+	+	+
64.	Podfam. Tanypodinae	Diptera – Chironomidae	+	+	+	+
65.	Podfam. Prodiamesinae	Diptera – Chironomidae		+	+	+
	Insecta - Trichoptera					
66.	<i>Anabolia</i> sp.	Trichoptera - Limnephilidae	+			+
67.	<i>Drusus botosaneanui</i> (Kumanski, 1968)	Trichoptera - Limnephilidae	+	+		
68.	<i>Potamophylax cingulatus</i> (Stephens, 1837)	Trichoptera - Limnephilidae	+		+	+
69.	<i>Potamophylax</i> sp.	Trichoptera - Limnephilidae	+			
70.	Fam. Limnephilidae	Trichoptera - Limnephilidae	+	+	+	
71.	<i>Silo pallipes</i> (Fabricius, 1781)	Trichoptera - Goeridae	+			+
72.	Fam. Goeridae	Trichoptera - Goeridae		+	+	
73.	<i>Hydropsyche angustipennis</i> (Curtis, 1834)	Trichoptera - Hydropsychidae	+	+		+
74.	<i>Hydropsyche pellucidula</i> (Curtis, 1834)	Trichoptera - Hydropsychidae	+	+		
75.	<i>Hydropsyche contubernalis</i> (McLachlan, 1865)	Trichoptera - Hydropsychidae				+

Nastavak Tabele 1. Kvalitativan sastav zajednice makrozoobentosa reke Skrapež

	Taksoni	Taksonomska pripadnost	SK1	SK2	SK3	SK4
	Insecta - Trichoptera					
76.	<i>Hydropsyche</i> sp.	Trichoptera - Hydropsychidae		+	+	+
77.	<i>Rhyacophila tristis</i> gr.	Trichoptera - Rhyacophilidae			+	+
78.	<i>Rhyacophila cf. fasciata</i>	Trichoptera - Rhyacophilidae			+	
79.	<i>Rhyacophila</i> sp.	Trichoptera - Rhyacophilidae	+	+	+	+
80.	<i>Sericostoma personatum</i> (Kirby & Spence, 1826)	Trichoptera - Sericostomatidae	+	+	+	+
81.	<i>Sericostoma schneideri</i> (Kolenati, 1848)	Trichoptera - Sericostomatidae		+	+	
82.	Fam. Sericostomatidae	Trichoptera - Sericostomatidae	+	+	+	

BIOGRAFIJA AUTORA

Milenka (Ljubinko) Božanić (devojačko prezime Žunić), rođena je 28.11.1987. godine u Užicu. Osnovnu školu „Aleksa Dejović” završila je u Sevojnu, a srednju Medicinsku školu u Užicu. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine, a diplomirala je 2012. godine. Iste godine upisuje master studije, koje završava 2013. godine sa prosečnom ocenom 10,00.

Doktorske studije upisala je 2013. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Entomologija. U periodu od 2014. do 2015. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2015. godine zaposlena je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, a od 2016. godine sa zvanjem istraživača saradnika.

Učestvuje u realizaciji praktičnog dela kursa „Životne zajednice slatkovodnih beskičmenjaka” na katedri za Zoologiju beskičmenjaka i entomologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Tokom dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada uzela je učešće u realizaciji jednog nacionalnog projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Unapređenje proizvodnih kapaciteta šarana (*Cyprinus carpio* L) programima ishrane i selekcije” (TR 31075).

Samostalno ili u koautorstvu objavila je 5 naučnih radova i 21 saopštenje na domaćim ili inostranim konferencijama.

Udata je i ima dvoje dece.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Миленка Љ. Божанић**

Број индекса: **Б3015/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Праћење утицаја пастрмског рибњака на ниво активности антиоксидативних ензима код ларве *Ephemera danica* (Insecta, Ephemeroptera)

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Миленка Љ. Божанић**

Број индекса: **Б3015/2013**

Студијски програм: **Биологија (Ентомологија)**

Наслов рада: **Праћење утицаја пастрмског рибњака на ниво активности антиоксидативних ензима код ларве *Ephemera danica* (Insecta, Ephemeroptera)**

Ментор: **др Ивана Живић, редовни професор**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Праћење утицаја пастрмског рибњака на ниво активности антиоксидативних ензима код ларве *Ephemera danica* (Insecta, Ephemeroptera)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.